Aus dem Max-Planck-Institut
für molekulare Genetik, Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Schuster

Identifizierung und Untersuchung des menschlichen zellulären myc Genproduktes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Benter
aus Hannover

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0044

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus dem Max-Planck-Institut
für molekulare Genetik, Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Schuster

Identifizierung und Untersuchung des menschlichen zellulären myc Genproduktes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Thomas Benter
aus Hannover

Referent: Prof. Dr. H.Rühl

1.) Korreferent: Prof. Dr. K.Sperling

2.) Korreferent: Prof. Dr. W.Knöchel

3.) Korreferent: Prof. Dr. T.Diamantstein

4.) Korreferent: Prof. Dr. G.Schultz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am 17.3.1986.

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der Forschung bei Retroviren 6
1.2. Retroviren 8
1.3. Virale Onkogene 11
1.4. Zelluläre Proto-Onkogene 13
1.5. Aufgabenstellung 15

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Liste der verwendeten Abkürzungen 16
2.1.2. Chemikalien 17
2.1.2.1. Radiochemikalien 17
2.1.3. Bakterienstämme,Plasmide und Medien
2.1.3.1. Bakterienstämme 18
2.1.3.2. Plasmide 18
2.1.3.3. Medien 18
2.1.4. Zellen und Nährmedien
2.1.4.1. Zellen 19
2.1.4.2. Nährmedien 19

2.2. Methoden

2.2.1. Transformation von Bakterien mit Plasmiden 20
2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA 21
2.2.3. Schnellpräparation von Plasmid-DNA 22
2.2.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen 23
2.2.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen 24
2.2.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 25
2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten 26
2.2.7.1. Klonierung des hu-c-myc Exon III in pP_Lc24 27
2.2.8 Elektrophpretische Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) 28

2.2.9.	Methoden zur Isolation des expressionsklonierten Proteins	30
2.2.10.	Proteinbestimmung	32
2.2.11.	Immunisierung der Kaninchen	33
2.2.12.	KLH-Kopplung der synthetischen Peptide	34
2.2.13.	Zytoplasmaisolierung zur RNA-Gehaltsbestimmung	35
2.2.14.	Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation	36
2.2.15.	RNA/DNA Filterhybridisierung	37
2.2.16.	Immuno-Blot	38
2.2.17.	Indirekte Radioimmunopräzipitation	40
2.2.18.	Herstellung von Immunaffinitätssäulen	41
2.2.19.	DNA-Filterbindungstest	43
2.2.20.	APAAP-Färbetechnik	45
2.2.21.	Lymphozytenstimulation	46

3.	Ergebnisse	
3.1.	Expressionsklonierung und Antikörpergewinnung	
3.1.1.	Klonierung des hu-c-myc Exon III in pP_Lc24	47
3.1.2.	Isolierung des MS2-hu-c-myc-Fusiosproteins aus Bakterien	52
3.1.3.	Synthetische Peptide	55
3.1.4.	Gewinnung der Antikörper und Isolierung von IgG durch Immunaffinitätschromatographie	58
3.2.	Charakterisierung des hu-c-myc Genproduktes	
3.2.1.	Auswahl der Zellinie COLO320 zur Identifizierung des hu-c-myc Genproduktes	59
3.2.2.	Identifizierung des hu-c-myc Genproduktes	62
3.2.3.	Reinigung des hu-c-myc Genproduktes mittels Immunaffinitätschromatographie	66
3.2.4.	Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit <u>in vitro</u>	70

3.3. Anwendung des Antikörpers

3.3.1. Histologische Untersuchungen mittels APAAP-Methode 73
3.3.2. Lymphozytenstimulation 75

4. Diskussion 78

5. Zusammenfassung 83

6. Literaturverzeichnis 84

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der Forschung bei Retroviren

Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist bekannt,daß Viren Tumoren erzeugen können.Zunächst entdeckte man die Übertragung der Leukämie beim Huhn durch Blutplasma und filtrierte leukämische Organauszüge (Bang und Ellermann 1908).Später wurde auch die Übertragung von Sarkomen beobachtet (Rous 1911,Fujinami 1914).Lange Zeit wurde nun angenommen,daß es sich bei diesen virusbedingten Tumoren um eine Ausnahme handelte und sie auf Hühner beschränkt sei.Erst im Jahre 1951 gelang der Beweis,daß auch bei Mäusen onkogene Viren vorkommen (Gross 1951).Weitere Untersuchungen ergaben,daß es sich bei diesen Viren um Mitglieder der Familie der Retroviren handelt.Mittlerweile sind bei vielen anderen Säugetieren solche Viren nachgewiesen und isoliert worden.

Der Nachweis,daß Viren auch beim Menschen Ursache einer malignen Erkrankung sein können,war experimentell wesentlich schwieriger.Zwar fand man bei Tumorpatienten oft Viren oder Viruspartikel,welche dann jedoch auch bei Gesunden gefunden wurden oder opportunistische Infektionen darstellten (Schlom et al.1971,Weiss 1973).Weiter fand man Viren in entarteten Humanzellkulturen,die sich als tierpathogene Viren erwiesen,welche menschliche kultivierte Zellen transformieren können (Nooter et al.1975,Panem et al.1975).Die Isolation eines wirklich neuen humanen Krebsvirus gelang 1980 aus einem T-Zell Lymphom (Mycosis fungoides) (Poiesz 1980).Wenig später wurde ein zweites Virus dieser als Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) bezeichneten Familie aus Zellen einer Haarzelleukämie isoliert (Kalyanaraman 1982).Besonders für das erstere Virus,HTLV I,ist aufgrund von experimentellen und epidemiologischen Daten gesichert,daß das Virus als ursächlich für die Erkrankung des Adult T-Cell Lymphom angesehen werden muß.Ein als Lymphadenopathy-associated Virus (LAV) oder HTLV III bezeichnetes Virus wird in jüngster Zeit für das Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) verantwortlich gemacht (Laurence 1984,Broder 1984).

Mit Hilfe der modernen Gentechnik war es möglich,das Genom der Retroviren genau zu erforschen.Ein Meilenstein der Forschung der Retroviren ist die Entdeckung der Onkogene (Martin et al.1970;Wang et al.1975;Coffin und Billeter 1976) sowie das Vorhandensein von verwandten Genen in eukaryontischen Zellen (Stehelin et al.1976).Im Folgenden wird auf die Retroviren und die Onkogene näher eingegangen.

1.2. Retroviren

Als Retroviren bezeichnet man eine Familie der RNA-Viren,deren gemeinsames Kennzeichen das Enzym Reverse Transkriptase ist.Dieses Enzym,das virale RNA in Doppelstrang-DNA übersetzt und damit den Vorgang der reversen Transkription ermöglicht,gab diesen Viren ihren Namen Retroviren.Chemisch sind die Retroviren alle sehr ähnlich aufgebaut.Sie bestehen zu etwa 60-70% aus Protein,zu 30-35% aus Lipid,zu 5% aus Kohlehydraten und zu 1.6% aus Nucleinsäure.

Ein Retrovirus trägt seine genetische Information in Form eines RNA-Komplexes in sich,welcher aus zwei identischen Untereinheiten besteht.Sie weisen Ähnlichkeiten mit eukaryontischer mRNA auf und können als direkte Matrize für die Proteinsynthese dienen.Meist birgt eine Retrovirus-RNA drei Gene in sich,deren Namen sich von den Proteinen,für die sie kodieren,ableiten.Ein Gen (ca. 2.0 kb lang) kodiert für ein Polyprotein,das posttranslatorisch in vier oder fünf Komponenten zerlegt wird.Diese Proteine bilden den inneren Viruskern,das Core des Virus.Das Gen wird als gag (group specific antigens) bezeichnet.Ein weiteres Gen,pol (polymerase) genannt,kodiert die Polymerase bzw. Reverse Transkriptase,die sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und eine als RNase H bezeichnete Aktivität besitzt (Baltimore 1970;Temin 1970;Mölling et al.1971).Dieses Enzym ist das entscheidene Instrument für den Replikationsmechanismus der Retroviren,wobei die RNA in doppelsträngige DNA transkribiert wird.In diesem Zustand können die Viren als sogenannte Proviren in die chromosomale DNA des infizierten Wirtsorganismus integrieren.Sie werden dann wie zelluläre Gene transkribiert.Das dritte notwendige Gen env (envelope) aller replikationsfähigen Retroviren kodiert für ein Glykoprotein,welches in die Hüllmembran,envelope,integriert wird.Durch diese Proteine wird das Wirtsspektrum der Viren bestimmt (Dickson 1982).Die drei beschriebenen Gene werden von zwei gleichen Nukleinsäuresequenzen flankiert.Diese Sequenzen,long terminal repeats (LTR),enthalten einen Promotor,der Enzymen aus der von Retroviren befallenen Wirtszelle eine Transkription der viralen Gene ermöglicht.

Ein mit den drei Genen gag-pol-env ausgestattetes Virus,das tatsächlich in der Natur sehr häufig ist,vermag,wenn überhaupt,nur nach längerer Latenzzeit Tumoren zu erzeugen.Dabei spielt wahrscheinlich die indirekte Aktivierung zellulärer Gene der Wirtszelle durch den Promotor des Virus eine große Rolle (Hayward et al.1981).Es gibt jedoch auch Retroviren,die akut Tumoren bei Tieren auslösen und auch in der Zellkultur schnell zu einer Zelltransformation führen.Diese Retroviren,auch Oncornaviren genannt,verfügen über ein zusätzliches Gen,ein Onkogen (v-onc).Erstmals gefunden wurde ein onc-Gen bei einem Vogel (Avian) -Retrovirus,dem Rous-Sarcoma-Virus (RSV)(Martin et al.1979).

Tumorerzeugende Vogelretroviren werden in vier Gruppen unterteilt.Die ersten drei Gruppen beinhalten die akuten-Leukämie-Vogelviren,die Familien der Myelocytomatoseviren (Vertreter:MC 29),der Avian Myeloblastoseviren (Vertreter:AMV) und der Erythroblastoseviren (Vertreter:AEV).Die vierte Gruppe stellen die Avian Sarcomviren dar (Vertreter:RSV).RSV ist unter den bekannten transformierenden Retroviren eine Ausnahme,weil es zusätzlich zu seinem onc-Gen ein für die Replikation notwendiges,vollständiges Genom (gag-pol-env) enthält.Alle anderen akut transformierenden Retroviren sind in einem oder mehreren der Replikationsgene deletiert (mit einem Δ vor dem jeweiligen Gen gekennzeichnet) und folglich allein nicht replikationsfähig.Diese defekten Viren sind bei ihrer Vermehrung auf sog. Helferviren angewiesen,welches Retroviren mit funktiontüchtigen gag-pol-env Genen sind,deren Genprodukte sie den deletierten Viren zur Verfügung stellen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 : Hühnerretroviren

Onkogen	Virus	Protein	Lokalisation	Merkmal	Tumor
myc	MH2,OK10	p55	Nukleus	DNA-Bindung	Myelozytom, Karzinom, Sarkom, malignes Lymphom
Δgag-myc	MC29,CMII	p110,p90	Nukleus	DNA-Bindung	
Δgag-myc'	HB-1	p108	Nukleus	DNA-Bindung	
Δgag- pol-myc	OK10	p200	Zytoplasma	DNA/RNA-Bindung	
Δgag-mil	MH2	p100	Zytoplasma	DNA/RNA-Bindung, Proteinkinase	Karzinom
myb	AMV	p45	Nukleus	DNA-Bindung (?)	Myeloblastom, Erythroblastom
Δgag-myb-ets	E26-E4	p135	Nukleus	DNA-Bindung	
Δgag-erbA	AEV,AEV-H	p75	Zytoplasma		Erythroblastom, Sarkom, Karzinom
erbB	AEV	p62-p74	Membran	Proteinkinase	
src	RSV,PR-C,BH	p60	Membran, Zytoplasma	Proteinkinase	Sarkom
Δgag-fps	FSV,PRCII,UR1	p130/140	Zytoplasma	Proteinkinase	
Δgag-yes	Y73,Esh	p80/90		Proteinkinase	
Δgag-ros	UR2	p68		Proteinkinase	

1.3. Virale Onkogene

Die Vermutung,daß ein kontinuierlich arbeitendes Gen eine Zelltransformation verursachen kann,wurde durch die Isolierung von temperaturempfindlichen Virusmutanten von RSV erhärtet (Martin et al.1970).Bei diesen Mutanten konnte das betroffene Gen reversibel inaktiviert werden.Die permissive Temperatur ließ eine Zelltransformation zu,während die restriktive Temperatur den Zellen innerhalb von Stunden ihr ursprüngliches,normales Aussehen wiederverlieh.Die Ursache dafür liegt im veränderten Genprodukt,in diesem Fall im Protein des onc-Gens des RSV,src (von sarcoma).Dieses Gen wurde mit sogenannten Deletionsmutanten,die durch eine Deletion im onc-Gen nicht mehr in der Lage sind,Zellen zu transformieren,näher beschrieben und seine Lage auf dem Virusgenom nahe des 3'-Endes bestimmt(Wang et al.1975).

Bei allen anderen akut transformierenden Retroviren fanden sich ebenfalls onc-Gene.Auf das in dieser Arbeit näher untersuchte onc-Gen der Myelocytomatosis-Virus Gruppe (s.o.) -myc- soll nun näher eingegangen werden.Der Prototyp dieser Virusgruppe,das MC29,wurde erstmals in Bulgarien isoliert (Ivanov,1964) und erzeugt bei Hühnern Myelozytomatose,Endotheliome,Leber- und Nierenkarzinome,Sarkome und Erythroblastose (Beard et al.1980,Graf und Beug 1978,Ivanov et al.1964,Mladenov et al.1967).*In vitro* transformiert das MC29 Fibroblasten und Makrophagen.Sein Genom ist in allen drei Strukturgenen gag-pol-env defekt und hat die Struktur gag-myc- env. Mittels Zellinien,die MC29 als Provirus enthalten,gelang es, MC29-DNA zu isolieren,diese zu klonieren (Lautenberger et al.1981,Vennström et al.1981) und das Genom des Virus zu sequenzieren (Alitalo et al.1983,Reddy et al.1983).Das onc-Gen,myc,wird mit dem deletierten gag-Gen zusammen transkribiert und translatiert.Produkt dieses gag-myc-Gens ist ein aus 450 Aminosäuren bestehendes Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 110kd,$p110^{gag-myc}$,welches an Serin- und Threoninresten phosphoryliert ist (Ramsay,1982).Genauere Untersuchungen des viralen myc Genproduktes ergaben,daß es im Kern der Zellen lokalisiert ist (Donner et al.1982) und hier mit dem Chromatin assoziert ist (Bunte et al.1982).*In vitro* zeigte sich eine DNA-bindende Aktivität des viralen myc-Proteins,wobei die

Region,die für die DNA-Bindung verantwortlich ist,näher lokalisiert werden konnte (Donner et al.1982,1983).Diese Lokalisation gelang mittels Mutanten des MC29-Virus,die für ein deletiertes myc-Protein kodieren und im Tier nicht mehr tumorigen sind (Enrietto et al.1982,Ramsay et al.1980).Nach Isolierung der deletierten myc-Proteine aus den Mutanten stellte sich heraus,daß sie in vitro eine stark reduzierte DNA-Bindung besitzen (Donner et al.1983).Auf dem Genom liegt diese DNA-Bindungsstelle im Bereich einer Nukleotidsequenz,die von der Restriktionsendonuclease Cla I erkannt wird,die sog. Cla I-Region,die sich etwa in der Mitte des Moleküls befindet.

1.4. Zelluläre Proto-Onkogene

Auf der Suche nach viralen Onkogenen (v-onc's) in Tumorzellen,wurden Gene entdeckt,die den v-onc's homolog waren,jedoch typische Merkmale der zellulären Gene trugen (Stehelin et al.1976).Zu diesen Merkmalen gehört,daß bei zellulären Genen zwischen den protein-kodierenden Bereichen (Exons) dazwischenliegende Bereiche (Introns),die nicht kodieren,enthalten sind.Diese zellulären Proto-Onkogene,c-onc's genannt,fanden sich auch bei normalen Zellen aller untersuchten Tierspezies,z.B. bei Drosophila melanogaster und sogar in Hefe (Shilo et al.1981,Gallwitz et al.1983).Die Tatsache das die c-onc-Gene in der Evolution so stark konserviert sind,läßt auf wichtige Funktionen in der Zellbiologie schließen.

Einige dieser Funktionen wurden aufgedeckt.So ergaben Vergleiche der Nukleotidsequenzen zwischen viralen Onkogenen und zellulären Genen,daß das onc-Gen des Simian Sarcoma Virus (SSV),v-sis,homolog dem Gen für eine Proteinkette des Platelet-derived Growth Faktor (PDGF) ist (Waterfield et al. 1983,Doolittle et al.1983,Heldin und Westermark 1984).Mittlerweile sind auch für weitere c-onc's die Funktionen in der Zelle erkannt.So ist das zelluläre Homologe des onc-Gens des Virus AEV (s.o.),erb B,das Gen für den Rezeptor des Epidermal Growth Faktor (EGF) (Downward et al.1984).Kürzlich wurde die Verwandtschaft des onc-Genprodukts eines Katzen(feline)-Sarcom-Virus mit dem Rezeptor des Granulocyten/Makrophagen colony-stimulating factors (CSF) gefunden (Sherr et al.1985).

Die zellulären Onkogene scheinen beim Krebsgschehen eine bedeutene Rolle zu spielen (Slamon et al.1984,Klein and Klein 1984).Zelluläre Onkogene können durch die im folgenden beschriebenen Mechanismen bei Tumoren in Erscheinung treten.

1. Retrovirale Infektion kann nach DNA-Integration des Virus durch die Aktivierung des viralen Promotors zu einer vermehrten Transkription eines dahinterliegenden c-onc-Gen führen (Hayward et al.1981).

2. Eine Punktmutation im Gen kann die Funktion eines c-onc-Genprodukts verändern (Der et al.1982,Capon et al.1983).

3. C-onc-Gene können durch Genamplifikation aktiviert werden (Westin et al.1982).

4. Chromosomentranslokationen können c-onc-Gene betreffen und zu erhöhter Aktivität führen (Taub et al.1982).

Die beiden zuletztgenannten Mechanismen spielen beim c-myc im Tumorgeschehen des Menschen eine große Rolle.Das humane,zelluläre myc,hu-c-myc,besteht aus drei Exons,wobei das erste nicht proteinkodierend ist (Watt et al.1983,Colby et al.1983).Die Genamplifikation wurde bei Promyelozytenleukämie,beim kleinzelligen Lungenkarzinom und beim Neuroblastom gefunden (Dalla Favera et al.1982,Little et al.1983,Schwab et al.1983).Beim Burkitt-Lymphom kommt die Aktivierung durch Chromosomentranslokation zustande.Das c-myc-Gen,das normalerweise auf dem Chromosom Nr.8 lokalisiert ist (Dalla Favera et al.1982),wird auf das Chromosom Nr.14 transloziert und gelangt dabei unter die Kontrolle von Genen,die für die Synthese der Immunglobuline verantwortlich sind und für eine starke Expression sorgen (Klein 1981,Taub et al 1982,Leder et al.1983).Deshalb kommt es zu einer hohen Expression des translozierten c-myc (Croce et al.1983).

1.5 Aufgabenstellung

Das myc-Onkogen hat besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen,weil es in einigen menschlichen Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen scheint.Im Burkitt Lymphom und z.B. dem kleinzelligen Lungenkarzinom war nachgewiesen worden,daß das myc Gen stark transkribiert wird.Diese Untersuchungen basierten auf dem Nachweis der myc spezifischen mRNA.

Diese Untersuchungen sollten auch auf der Ebene der Proteinexpression durchgeführt werden.Einerseits könnte das Protein ein Tumormarker sein,andererseits ist es ein wichtiges genregulatorisch wirkendes Molekül.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit,das menschliche myc Protein zu identifizieren.Da keine natürlichen Antikörper gegen das Protein vorkommen,mußten dafür gentechnologische Ansätze zu Hilfe genommen werden.So mußte das myc Gen in einen Expressionsvektor einkloniert und in Bakterien zur Expression gebracht werden.Ein weiterer Weg war die Verwendung synthetischer Oligopeptide.Mit den so gewonnenen Antigenen gelang es,Antikörper herzustellen,welche ein Molekül von 64000 D erkannten,das als das menschliche myc Protein identifiziert wurde.Dieses Protein sollte biochemisch und biologisch charakterisiert werden.Es handelt sich um ein Kernantigen,welches *in vitro* an DNA bindet.

Weiterhin wurde die Spezifität der Antikörper gegen myc Protein in menschlichem Gewebe getestet.Außerdem wurden humane,zur Proliferation stimulierte Lymphozyten auf myc Protein-Expression untersucht.Diese Versuche sind als Vorversuche für das Auffinden von Tumormarkern aufzufassen.

2. Material und Methoden

2.1.1. Liste der verwendeten Abkürzungen

Ap	Ampicillin
Ap^r	Resistenz gegen Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bis	N,N'Methylbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovin-Serumalbumin
cpm	counts per minute
D	Dalton
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Äthylenglycol-bis-(2-aminoäthyl)-Tetraessigsäure
F.A.	Freundsches Adjuvanz
F.C.A.	Freundsches komplettes Adjuvanz
g	Erdbeschleunigung
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
Kn	Kanamycin
Kn^r	Resistenz gegen Kanamycin
M	Mol
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Rip	Radioimmunopräzipitation
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tc	Tetracyclin
Tc^r	Resistenz gegen Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin
Tris	Trihydroxymethyl-Aminomethan
U	Einheit (für Enzymmengen)

2.1.2. Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid,Bis-acrylamid	BioRad
Agarose	BioRad
Antibiotika	Sigma
Coomassie Brilliant Blau	Serva
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Boehringer
Dithiothreitol	Sigma
DNA-Polymerase I (Kornberg)	Boehringer
DNase I	Boehringer
Ethidium-Bromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
Harnstoff	BRL
Lysozym	Worthington
Nitrozellulosefilter	Schleicher und Schüll
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	Boehringer,
(Bam H I,Bcl I,Cla I,Sal I,XHO II)	New England Biolabs
RNase	Boehringer
SDS	BioRad
Sepharose-4B	Pharmacia
Temed	BioRad

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.a. von der Firma Merck bezogen.

2.1.2.1. Radiochemikalien

^{35}S-Methionin (600 Ci/mMol)	Amersham-Buchler
(a-^{32}P)-dCTP (500 Ci/mMol)	Amersham-Buchler
Goat anti-rabbit IgG (^{125}J-) (100uCi/ml) bzw.(5.34uCi/ug)	Amersham-Buchler
^{3}H-Thymidin (50 Ci/mMol)	Amersham-Buchler

2.1.3. Bakterienstämme,Plasmide und Medien

2.1.3.1. Bakterienstämme

Stamm	Referenzen
HB101	(Boyer and Roulland-Dussiox 1969)
C600	(Appleyard 1954)
537	pcI857 in C600,(Kuepper et al.1982)
GM33	(Morinus and Morris 1975)

2.1.3.2. Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenzen
pBR322	Ap^r,Tc^r	(Bolivar et al.1977)
pMC41	Ap^r,Tc^r	(Dalla Favera et al.1982)
pMC41-3rc	Ap^r,Tc^r	(Dalla Favera et al.1982)
pP_Lc24	Ap^r	(Remaut et al.1981)
p-myc5/30 Sal	Ap^r	(Bunte et al.1984)
pMC29T.P.	Ap^r	(Lautenberger et al.1981)

2.1.3.3. Medien

TY-Medium:
10g Bacto Trypton (Difco),5g Bacto Yeast Extract (Difco),10g NaCl pro Liter demineralisierten Wassers

TY-Platten:
8g Bacto Trypton,5g Bacto Yeast Extract,15g Bacto Agar (Difco),5g NaCl,0.017g $MnSO_4 \times H_2O$ pro Liter demineralisierten Wassers

Je nach enthaltenem Plasmid wurde folgende Konzentrationen von Antibiotika den Medien zugesetzt:

Tc	12.5ug/ml
Ap	35.0ug/ml
Kn	50.0ug/ml

2.1.4. Zellen und Nährmedien

2.1.4.1. Zellen

Name	Ursprung	Referenzen
Hela	Zervixkarzinom	(Puck et al.1956)
COLO320	Kolonkarzinom	(Alitalo et al.1983)
HL-60	Promyelozytenleukämie	(Collins and Groudine 1982)
Raji	Burkitt-Lymphom	(Zech et al.1976)
Q8MC29	MC29infizierte Hühnerfibroblasten	(siehe Mölling 1985)
Q10H	Q10Hinfizierte Hühnerfibroblasten	(siehe Mölling 1985)
HB-1	HB-1infizierte Hühnerfibroblasten	(siehe Mölling 1985)
QEF	MH2infizierte Hühnerfibroblasten	(siehe Mölling 1985)

2.1.4.2. Nährmedien

Alle menschlichen Tumorzellinien wurden in Dulbeccos modifizierten Eagles Medium (DMEM) gezüchtet.Es wurde 10% Fötales Kälberserum (FCS) hinzugesetzt.Eine Ausnahme bildete Hela,wo 5% FCS hinzugefügt wurde.

Die virustransformierten Hühnerfibroblasten wurden in DMEM-RPMI (Gibco) mit 5% Tryptose-Phosphat Brühe, 0.5% DMSO, 5mM N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N -2-Aethan-Sulfonsäure, 5% Kälberserum und 1% Hühnerserum gezüchtet.

Zur radioaktiven Markierung der Proteine wurden die Zellen in Methionin-freiem Medium mit ^{35}S-Methionin (250-500 uCi/ml) für 90-240 Min. belassen.Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen,lysiert und weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.1. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Um in Bakterien Plasmide einschleusen zu können,ist es notwendig,die Bakterien für die Aufnahme der Plasmide vorzubereiten.Dies geschieht in der Herstellung von sogenannten kompetenten Zellen.

Dazu wurde eine 20 ml Kultur der gewünschten Bakterien in die logarithmische Wachstumsphase gebracht,die Dichte beträgt dabei ca. 10^9 Bakterien/ml.Sie wurde spektrometrisch ermittelt,wobei 1 OD bei 550 nm einer Dichte von ca. 5×10^7 Bakterien/ml entspricht.Die Bakterien wurden dann in sterilen 10 ml Röhrchen bei 5000 rpm 10 Min. in einer Minifuge abzentrifugiert und der Überstand dekantiert.Das Sediment wurde mit 10 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung aufgenommen, resuspendiert und 30 Min. auf Eis gestellt.Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Bakterien nun in 1 ml $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und waren nun als kompetente Zellen für die Plasmidaufnahme bereit.

Zur Aufnahme der Plasmide wurden 200 ul kompetente Zellen mit 1 ug Plasmid-DNA in ein Eppendorf-Röhrchen mit $CaCl_2$-Lösung auf ein Reaktionsvolumen von 300ul gebracht.Nachdem dieser Ansatz 15 Min. auf Eis gestanden hatte,wurde durch einen 40°C -Hitzeschock über zwei Minuten erreicht,daß die DNA die Bakterienwand und -membran durchdringt.Im Anschluß daran wurde 1 ml Nährmedium hinzugefügt,um die Bakterien bei 37° über 30 Min. wachsen zu lassen.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Bakterien auf eine Agarplatte,welche das Antibiotikum enthielt,gegen das das jeweilige Plasmid den Bakterien die Resistenz verlieh,ausgestrichen.Nach 37°C Inkubation über Nacht konnten selektiv einzelne Bakterienkolonien mit der Impföse aufgenommen werden und in 5 ml TY-Nährmedium weiter inkubiert werden.Dies geschah im Luftschüttler bei 37°C.

Lösung:

$CaCl_2$: 50 mM $CaCl_2$ in Aqua bidest.

2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden 20 ml TY-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt und mit wenigen ul einer Bakteriensuspension bzw. mit einer Platinöse einer Agarplattenbakterienkultur,die das betreffende Plasmid enthielten,beimpft.Nach 5-6 Std Inkubation bei 37°C wurde diese 20 ml Kultur mit 1l TY-Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C inkubiert.Anschließend wurden die Zellen in einer Sorvall RC-5 Zentrifuge 10 Min. bei 4°C und 5000 rpm pelletiert.Die Bakterien wurden in 30 ml kalter Saccharoselösung resuspendiert und nach Zugabe von 6 ml Lysozymlösung,15ml EDTA und 8ml Triton X-100 bei bei 0°C für 30 Min. inkubiert.Nach dieser Zelllyse wurde die Suspension bei 4°C und 10^4 rpm für 45 Min. in einem SS 34 Rotor zentrifugiert.Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 2 ml Ethidium-Bromidlösung und Einstellen mit CsCl auf eine Dichte von 1.55 in einer Beckmann-Ultrazentrifuge für ca. 48 Stunden in einem 50Ti Rotor bei 15°C zentrifugiert.Danach wurde unter langwelligem UV-Licht die Plasmid-DNA-Bande identifiziert und nach Anstechen des Röhrchens mit einer Nadel gewonnen.Diese Plasmidlösung wurde viermal mit einer Isopropanollösung zum Entfernen des Ethidium-Bromids ausgeschüttelt.Danach konnte die DNA präzipitiert werden.Hierzu wurde die DNA mit TE-Puffer 1:4 verdünnt,mit 2.5 Volumen Isopropanol p.a. und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat bei -20°C über Nacht präzipitiert.Nach dem Zentrifugieren (10 000 rpm bei 0°C über 10 Min.) wurde das Präzipitat mit 70%igem Äthanol p.a. zweimal gewaschen.Das Sediment wurde mit 300 ul TE-Puffer gelöst und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Saccharoselösung :	25% Saccharose in 50 mM Tris-HCl pH 8.0
Lysozymlösung :	10 mg/ml in 250 mM Tris-HCl pH 8.0
EDTA-Lösung :	25 mM EDTA
Triton x-100 :	10% Triton x-100 in 50 mM Tris-HCl pH 8.0
Ethidium-Bromid :	10 mg/ml Ethidium-Bromid in Aqua bidest.
CsCl :	Dichte 1.55 g/ml in 50mM Tris-HCl pH 8.0
Isopropanollösung :	90% Isopropanol, 10% H_2O mit CsCl gesättigt
TE-Puffer :	10mM Tris, 1mM EDTA pH 7.0

2.2.3. Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA von transformierten Bakterien,z.B. nach einer Ligation,überblicken und mit anderer DNA vergleichen zu können,wurde eine Schnellpräparation der Plasmid-DNA vorgenommen.

Hierbei werden die Bakterien einer 4 ml Kultur mit einer Eppendorfzentrifuge 1 Min. abzentrifugiert und der Überstand verworfen.Das Pellet wurde bei 4°C mit einer 25%igen Saccharoselösung resuspendiert und mit 35 ul einer Lysozym-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 300 ul M-stet-Lösung und 1 ul RNase wurde das Eppendorfreaktionsgefäß 1 Min. in kochendes Wasser gestellt,um,nach dem Abkühlen auf Eis,30 Min. bei 4°C zentrifugiert zu werden.Das Pellet,bestehend aus chromosomaler DNA,wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.Die übrige Plasmidhaltige Lösung wurde mit 250 ul Aqua bidest. aufgefüllt und mit 200 ul Phenol vermischt.Die Proteine gelangen in die Phenolphase,während die Nukleinsäuren im wässrigen Milieu verbleiben.Die wässrige Phase wurde abgenommen,in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine zweite Phenolextraktion schloß sich an.

Mit dem 2.5fachen Volumen wurde nun die wäßrige Phase mit -20°C kaltem Äthanol versetzt und 1-2 Std. bei -70°C gelagert.Es schloß sich eine weitere Zentrifugation über 30 Min. in der Eppendorfzentrifuge an.Die nunmehr präzipitierte DNA wurde,nach Entfernung des Überstandes,durch zweimaliges,vorsichtiges Überschichten und Abgießen mit 70%igem Äthanol von den Salzen befreit und in Aqua bidest. aufgenommen.

Die so erhaltene DNA konnte direkt in Agarosegel oder nach weiterem Verdau mit Restriktionsendonucleasen analysiert werden.

Puffer und Lösungen:

Saccharoselösung : 25% Saccharose in 50 mM Tris-Hcl pH 8.0

Lysozymlösung : 10 mg/ml Lysozym in 250 mM Tris-HCl pH 8.0

M-stet-Lösung : 5% Triton x-100, 50mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5% Saccharose in Aqua bidest.

Phenol : 80% Phenol in 0.5 M Tris

2.2.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einem Reaktionsvolumen von 20 ul wurden zu 1 ug DNA 1-2 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease (meist 1-5 ul) und der dazu notwendige 10 x Restriktionsendonukleasepuffer gegeben.Da die verschiedenen Restriktionsendonukleasen ihr Reaktionsoptimum bei unterschiedlichem Salzgehalt haben,wurden drei Restriktionsendonukleasepuffer verwendet.Nach Auffüllen des Ansatzes mit Aqua bidest. wurde 1-4 Std bei 37°C inkubiert.

Nach Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden 20 ul dieses Ansatzes mit 5 ul 5xDNA-Stoppuffer versetzt und in die Tasche eines Agarosegels gebracht.

Puffer:

10 x Restriktionsendonukleasepuffer je nach Enzym (Maniatis et al.1982)

Niedrig-Salz-Puffer : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT

Mittel-Salz-Puffer : 50 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT

Hoch-Salz-Puffer : 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT

5 x DNA-Stoppuffer : 20% Ficoll, 0.3% SDS, 89 mM Tris-Base, 2.5 mM EDTA, 89 mM Borsäure; pH 8.3, 4% Bromphenolblau

2.2.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Konzentration der Agarose lag bei kleinen Fragmenten (kleiner als 0.56 kb) bei 2% ,üblicherweise jedoch bei 0.8% in den verwendeten Agarosegelen.Bei der Herstellung wurden ca. 200 ml TAE-Puffer mit Agarose im Mikrowellenherd aufgekocht.Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die nunmehr flüßige Agarose auf eine 14x12cm Glasplatte,die mit einem Klebestreifen umrandet war,ca. 6 mm hoch gegossen.Um Taschen für die Auftragung der DNA zu erhalten,wurde ein Gelkamm mit 14 Taschen (je 2x5mm Grundfläche) ca. 4mm in die Agarose eingetaucht.Nach dem Abkühlen wurde das Agarosegel mit der Glasplatte horizontal in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt.

Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen (254 nm bei analytischen Gelen,366 nm bei präparativen Gelen),wurde Ethidiumbromid (0.5ug/ml) dem Puffer zugefügt.

Die Elektrophorese wurde bei 40 V ca. 10 Std durchgeführt.Sobald die Bromphenolblau-Lauffront des DNA-Stoppuffers ca. 2/3 der Gellänge zurückgelegt hatte,wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und mit einem Orangefilter mit einem Polaroid-Film Typ 57 photographiert (üblicherweise 1 sec bei offener Blende).

Als Marker dienten die DNA-Fragmente des mit HAE III verdauten pBR322.Die Fragmente hatten folgende Längen (in bp): 587/540/504/458/434// 267/234/213/192/184// 124/123/104/89/80/64/57/51

Puffer:

TAE-Puffer : 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA

2.2.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von langwelligen UV-Licht (366 nm) mit dem Skalpell aus dem jeweiligen Agarosegel herausgeschnitten und in einen mit TAE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch überführt und luftdicht verschloßen.Der Dialyseschlauch mit dem Agarosestück wurde senkrecht zur Stromflußrichtung in die,mit TAE-Puffer gefüllte,Elektrophoresekammer gelegt.Nachdem für 90 Min. eine Spannung von 150 V angelegt war,wurde durch 10 sec dauernde Umpolung erreicht,daß sich die DNA vom Dialyseschlauch löste und mit dem Puffer entnommen werden konnte.Diese Lösung wurde mit 4 M NaCl auf 0.2 M NaCl eingestellt.Das Agarosegel wurde mit UV-Licht auf eventuell nicht eluierte DNA kontrolliert (die Nachweisgrenze von DNA mit interkaliertem Ethidiumbromid beträgt 50 ng).

Die gewonnene DNA wurde mit einer Elutip-Säule (Schleicher und Schüll) weiter gereinigt.Hierbei wurde die Säule zunächst mit 2 ml hoch-Salz-Lösung mittels einer Spritze präpariert und anschließend mit 5 ml niedrig-Salz-Lösung durchspült.Nun wurde die DNA-Lösung,die über einen Zellulose-Acetat Filter mit einer Porengröße von 0.45 um vorgereinigt wurde,langsam durch die Säule gedrückt,damit DNA an das Säulenmaterial binden konnte.Unspezifisch bindende Substanzen wurden durch weiteres Spülen mit 3 ml niedrig-Salz-Lösung entfernt.Nun konnte die DNA mit 0.5 ml hoch-Salz-Lösung eluiert werden.

Die Menge der DNA wurde mit einem Eppendorf-Spektometer gemessen,wobei 1 OD bei 260 nm ca. 50 ug DNA/ml entspricht.Die Reinheit wurde mit dem Quotient der OD bei 260nm/280nm errechnet.Ein Verhältnis von 1.8 liegt bei reiner DNA vor,ist das Verhältnis größer,so spricht dies für RNA-Verunreinigung,ist es kleiner,für das Vorhandensein von Protein.

Die gereinigte DNA-Lösung wurde weiterhin mit dem 2.5fachen des Volumens von -20°C kaltem Äthanol versetzt und bei -70° nach 1-2 Stunden zur Präzipitation gebracht.Nach anschließender Zentrifugation mit einer Eppendorfzentrifuge über 30 Min. wurden

die Salze aus dem DNA-Präzipitat durch vorsichtiges zweimaliges Überschichten mit 70%igem Äthanol herausgelöst.Die DNA wurde nun mit Aqua bidest. gelöst,sofort weiter verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

TAE-Puffer : 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM Na-Acetat, 1mM EDTA
hoch-Salz-Puffer : 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA
niedrig-Salz-Puffer : 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden DNA-Fragmente gebracht,deren einzelsträngige,überstehende Enden sich komplementär verhielten.Diese sog. klebrigen Enden entstehen meist durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen.Bei einem Reaktionsansatz von 30 ul wurden 3 ul 10 x Ligationspuffer,ca. 3 ug DNA-Fragmente und 3 ul T4-DNA Ligase mit Aqua bidest. auf das gewünschte Volumen gebracht. Die Ligation erfolgte bei 15°C im Wasserbad über Nacht.

Puffer:
10 x Ligationspuffer : 660 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM $MgCl_2$, 50mM DTT, 10 mM ATP

2.2.7.1. Klonierung des hu-c-myc Exon III in pPLC 24

Zunächst wurden 20 ug p-myc 5/30 Sal DNA,bestehend aus pPLc24-c-myc,mit 40 U Cla I und anschließend mit 40 U Bam H I in einem 100-150 ul Ansatz je zwei Stunden verdaut,mit Phenol gereinigt(siehe 2.2.3.),Äthanol präzipitiert (siehe 2.2.6.) und auf einem 0.8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.Unter langwelligem UV-Licht wurde die obere Bande herausgeschnitten, elektrophoretisch eluiert,mit Elutip gereinigt und äthanolgefällt.

Für die Isolierung des Cla I-Bcl I Fragments wurden 20 ug pMC41-rc DNA mit 25 U Cla I,dann mit 40 U Bcl I je zwei Stunden inkubiert.Da Bcl I nur an nicht-methylierten DNA-Sequenzen schneidet,wurde das Plasmid in einem Bakterienstamm vermehrt,der nicht die DNA methyliert (GM 33).Nach dem Verdau wurde die untere Bande herausgeschnitten, elektrophoretisch isoliert,mit Elutip gereinigt und mit Äthanol gefällt.

In einem 30 ul Ligationsansatz wurden 2 ug des vorbereiteten p-myc 5/30Sal und 10 ug des Cla I-Bcl I Fragments mit 3 U T4 Ligase 20 Stunden inkubiert,danach wiederum mit Phenol und Äthanolfällung gereinigt.Die ligierte DNA wurde in kompetente Zellen des Bakterienstammes 537 transformiert.Die Bakterien wurden auf Ap.+Kn. haltigen Agarplatten ausgestrichen und 12 Stunden bei 30°C bebrütet.Von den mehr als 1000 gewachsenen Kolonien wurden 20 in je 1 ml TY-Medium mit Ap+Kn 12 Stunden hochgezogen.Die Induktion des Lambda-Promotors erfolgte durch Zugabe von 5 ml 42°C warmen TY-Mediums über 4 Stunden.Nach anschließender Abzentrifugation wurden die Bakterien in 100 ul Aqua bidest. und 100 ul 4xProben-Puffer 30 Min. im Wasserbad gekocht.Je 60 ul dieses Lysats wurden auf einem SDS-Gel analysiert.19 Klone zeigten im Vergleich zum p-myc 5/30 Sal ein verändertes Molekulargewicht des bakteriellen Fusionsproteins von 10000-20000 D.Von einem Klon,p6/4,wurde Plasmid-DNA gereinigt und weiter analysiert.

2.2.8. Elektrophpretische Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid-Flachgele hergestellt. Im einzelnen wurden dabei zwischen zwei 27x24 cm großen Glasplatten drei 1 mm dicke Distanzstäbe gelegt und diese drei Seiten mit 2%iger erhitzter Agaroselösung abgedichtet. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Lösung des Trenngels zwischen die Glasplatten gegossen und mit Aqua bidest. gesättigter n-Butanollösung überschichtet, um eine gerade Trenngeloberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde die n-Butanollösung mit Aqua bidest. ausgewaschen und das Sammelgel eingefüllt. Um Geltaschen zu erhalten, wurde ein Gelkamm mit bis zu 29 Taschen in das Sammelgel geschoben. Nach 30 Min. wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Laemmli-Puffer überschichtet. Bis zum Gebrauch wurde es bei 4°C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung selbst wurde in einer Vertikalelektrophoresekammer bei 80 V über Nacht durchgeführt. Die Proteinproben, die mit dem entsprechenden Volumen 4xProben-Puffer versetzt waren, wurden mit einer Hamiltonspritze in die Taschen des Sammelgels eingefüllt (Höchstvolumen 100ul). Nach dem Lauf wurden die Gele herausgenommenen, direkt getrocknet (siehe Rip, 2.2.17), weiter verarbeitet (siehe Methoden zur Protein Isolation, 2.2.9.) oder gefärbt.

Die Färbung wurde mit einer Lösung von 0.4% Coomassie Brilliant Blau G-250, 50% Methanol und 10% Eisessig für 20 Min. gefärbt und anschließend 2-8 Std in 5% Methanol und 10% Eisessig entfärbt. Das so behandelte Proteingel wurde mit einem Polaroidfilm Typ 55 bei Blende 5.6 und einer Belichtungszeit von 0.25 sec auf einem Lichtkasten photographiert.

Puffer und Lösungen:

Die Lösungen für die Gele wurden wie folgt aus den Stammlösungen hergestellt.

Stammlösung	Trenngel	Sammelgel
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	7.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 8.8		3.9 ml
30 g Acrylamid,0.8 Bis pro 100 ml Aqua bidest	19.5 ml	5.1 ml
Temed	10 ul	10 ul
SDS (20%ig)	300 ul	150 ul
H_2O	31.2 ml	20.6 ml
APS	300 ul	100 ul

4xProbenpuffer : 40% Glycerin, 0.8% SDS, 12% β-Mercaptoäthanol, 4% Bromphenolblau

Lämmli-Puffer :25 mM Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS; pH8.3

2.2.9. Methoden zur Isolation des expressionsklonierten Proteins

Die E. coli. Bakterien 537 wurden in 100 ml Nährmedium mit Antibiotika über Nacht bei 30°C inkubiert.Am nächsten Morgen folgte die Induktion zur Proteinexpression durch Zugabe von 400 ml 42°C warmen Nährmediums und Verteilung auf 5 Erlenmeyerkolben (je 500 ml-Fassungsvermögen) über 4 Std..Nach Sammeln der Bakteriensuspension in Sorvall GSA-Rotor-Bechern und anschließender Abzentrifugation bei 5000 rpm über 20 Min. wurde das Pellet mit 10 ml Aqua bidest. resuspendiert.Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 10 ml 4x Proben-Puffer und Erhitzen der Proben auf 95°C über 30 Min..Die Proteine dieses Bakterienlysats wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel (10%) aufgetrennt.Dieses geschah in einer Vertikalelektrophoresekammer bei einer Spannung von 80 V,bis die Lauffront des Bromphenolblaus die untere Gelgrenze erreichte.Pro Geltasche wurden bis zu 100 ul Lysat eingesetzt.Nach Beendigung der Elektrophorese wurden an beiden Seiten des Gels 4 cm breite Streifen mit Markierungen abgeschnitten,so daß nach der folgenden Färbung mit Coomassie Brilliant Blau die Gelstreifen wieder an das Gel angefügt werden konnten.Das mit Hilfe der Seitenstreifen identifizierte exprimierte Protein wurde anschließend unter Zuhilfenahme eines Lineals aus dem ungefärbten Gel herausgeschnitten.Die Gelscheiben wurden mit einem Glashomogenisator homogenisiert und anschließend nach Zugabe von 5 ml PBS über 3-4 Stunden auf einem Schüttler belassen.Dabei wurden etwa 90% des Proteins eluiert.Mit Hilfe einer Glasfritte wurde der Gelrückstand von dem Überstand getrennt und dieser zum Immunisieren verwendet.

Eine weitere Methode zur Isolation des expressionsklonierten Proteins stellte der sog. Harnstoffaufschluß dar.Hierbei wurden die Bakterien wie in der oben beschriebenen Methode durch Temperaturerhöhung induziert,abzentrifugiert,nach dem Dekantieren des Überstandes in 10 ml TNE aufgenommen und erneut wie oben beschrieben abzentifugiert.Das so gewaschene Pellet wurde anschließend in 3 ml 10%iger Saccharoselösung resuspendiert und mit 750 ul Lysozym (10mg/ml) und 750 ul 0.2 M EDTA-Lösung versetzt.Diese Suspension wurde zur Lyse der Bakterien 2 Min. bei

37°C und weitere 30 Min. bei 4°C inkubiert. Daran schloß sich eine Ultraschallbehandlung von 4x15 sec mit 70 Watt an.Anschließend wurden 450 ul 10% Triton X-100 zugefügt.Nach 30 Min. bei 4°C wurde das Lysat mit 10.000 rpm im HB-4-Roter in einer Zentrifuge (Sorvall) zentifugiert.Das dabei entstandene Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 10 ml 1 M Harnstofflösung mit 5% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCL pH 7.5 resuspendiert.Nach weiteren 30 Min. bei 4°C wurde das Lysat nach den gleichen Bedingungen zentrifugiert,das Pellet jedoch in 7 M Harnstofflösung in 50 mM Tris- HCL pH 7.5 gelöst.Daran schloß sich eine Ultazentrifugation mit 45.000 rpm über 25 Std. bei 4°C im Polycarbonatröhrchen im 50 Ti Rotor in der Ultrazentrifuge (Beckmann) an. Zur weiteren Aufarbeitung wurde der so gewonnene Überstand auf eine Sephadex A25 Säule aufgetragen,die wie folgt vorbereitet worden war.Pro Säule wurden 2 g DEAE Sephadex A25 in 15 ml 7 M Harnstofflösung in 50 mM Tris-HCL pH 7.5 gegeben.Nach einstündigem Quellen wurden 10 ml davon in eine Säule (Pharmacia) bei 4°C im Minicoldlab (LKB) eingefüllt.Der Auslauf der Säule war mit einer Mikroperpex-Pumpe (LKB) verbunden.Auf diese Säule wurde der Überstand des Bakterienlysates aufgetragen.Dabei wurde eine Pumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 15 ml/Std. verwendet.Mit einem Fraktionssammler (LKB) wurden 0.5-1.2 ml Portionen gesammelt.Davon wurden je 30 ul mit 4x Proben-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 40 ul gebracht und mittels PAGE (2.2.8.) diejenigen Fraktionen herausgesucht,die das gewünschte Protein angereichert enthielten.Diese Proteinfraktionen wurden in einen Dialyseschlauch überführt,der vorher ausgekocht worden war,und gegen PBS über Nacht dialysiert,wobei ein Teil der gelösten Proteine wieder ausfiel.Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Puffer und Lösungen:

4x Probenpuffer : 40% Glycerin, 0.8% SDS,
12% β-Mercaptoäthanol, 4% Bromphenolblau
TNE : 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl,
2 mM EDTA

2.2.10. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde eine Methode gewählt,die weitgehend von Störionen unabhängig ist.Es wurden Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen als Standard mitgeführt.Es wurde ein Teil derjeweiligen Proteinlösung,meist 100 ul,mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 270 ul gebracht.Diesem wurden 30 ul einer 1%ige SDS-Lösung in 1 M Tris-HCL pH 7.5 zugefügt.Nach Mischen des Ansatzes wurden 60 ul einer 60%igen TCA-Lösung zugefügt und bei Raumtemperatur 2 Min. inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Nitrozellulosefilter (Millipore HAWP 02500) mit 6%iger TCA-Lösung vorgewaschen und auf ein Vakuumfiltriergerät (Milipore) gelegt.Nun wurden die Proben mit einer Pasteurpipette unter Vakuumsog auf die Nitrozellulosefilter getropft.Die Pipette und die Probenröhrchen wurden mit je 300 ul 6%iger TCA-Lösung nachgespült,und die Lösung ebenfalls auf die Nitrozellulosefilter getropft.Nach zweimaligem Waschen mit 6%iger TCA-Lösung wurden die Filter in Petrischälchen (Durchmesser 9,5cm) mit der Amidoschwarz 10B-Lösung 3 Min. gefärbt.Die Anteile der Filter,auf denen kein Protein aufgetropft war,wurden durch eine Methanol/Eisessig-Lösung in drei aufeinanderfolgenden Bädern je eine Minute entfärbt.Darauf folgte ein zweiminütiges H_2O-Bad und Trocknen der Filter auf 3MM Papier(Whatman).Die Proteine auf den Filtern waren nun durch das Amidoschwarz je nach ihrer Konzentration zu erkennen.

Um die Konzentration der Proteine zu messen,wurden nun die Filter mit 600ul einer Entfärbelösung 30 Min. bis 2 Std. eluiert.Von dieser Lösung wurde die jeweilige optische Dichte bei 630 nm im Eppendorf-Spektrometer gemessen.Die Werte für die Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen wurden graphisch dargestellt und als Standard für die weiteren Proteinlösungen verwendet.

Lösungen:

Amidoschwarz 10 B-Lösung : 0.1% Amidoschwarz 10 B

Methanol/Eisessig-Lösung : 90% Methanol, 2% Äthanol, 8% Aqua bidest.

Entfärbelösung : 25 mM NaOH, 0.05 mM EDTA, 50% Äthanol

2.2.11. Immunisierung der Kaninchen

Die Antiseren gegen das menschliche myc-Genprodukt wurden Kaninchen entnommen,die nach dem folgenden Schema durch subkutane Injektion an vier Orten in den Rücken immunisiert waren.Vor der Injektion wurden die Proteinlösungen mit Freundschen Komplettem Adjuvanz (F.C.A.) bzw. Freundschem Adjuvanz (F.A.) emulgiert.

TAG	Injektion
1	750ul Protein + 750ul F.C.A.
7	750ul Protein + 750ul F.C.A.
14	750ul Protein + 750ul F.A.
30	750ul Protein + 750ul F.A.
40	750ul Protein + 750ul F.A.
48	---------- ----------

Gleichzeitig wurden bei jeder Immunisierung etwa 30-50 ml Blut mittels Saugglocke aus dem angeritzten Ohr entnommen.Das gewonnene Blut wurde nach vollständiger Gerinnung 30 Min. mit 12.000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor(Sorvall) zentrifugiert,und das Serum nach Komplementhitzeinaktivierung (30 Min.,56°C) bei -20°C gelagert.Zur Kennzeichnung der Seren diente die Nummer des jeweiligen Kaninchens und die Anzahl der bisherigen Blutentnahmen.

2.2.12. KLH-Kopplung der synthetischen Peptide

Um mit synthetischen Peptiden Kaninchen immunisieren zu können,mußten sie vorher an ein Trägerprotein gekoppelt werden.Dazu diente das keyhole limpet hemocyanin(KLH),ein seltenes Blutegelprotein.

Es wurden 2 mg des synthetische Peptids in 10 ul Aqua bidest. gelöst.Diese Lösung wurde zu 15 mg KLH,das zuvor in 2 ml Natrium-Phosphat Puffer gelöst worden war,zugefügt.Anschließend wurde 1 ml Glutaraldehyd-Lösung tropfenweise über eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben.Diese Lösung reagierte über Nacht.Am nächsten Tag wurde der Ansatz gegen PBS dialysiert.In dieser Form stand das gekoppelte Peptid zur Immunisierung zur Verfügung.

Puffer und Lösungen:

Natrium-Phosphat Puffer : 40 mM NaH_2PO_4, 60 mM Na_2HPO_4

Glutaraldehyd-Lösung : 21 mM Glutaraldehyd in Aqua bidest.

PBS : 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 120 mM NaCl, pH 7.2

2.2.13. Zytoplasmaisolierung zur RNA-Gehaltsbestimmung

Um den myc-spezifischen mRNA Gehalt einiger Zellinien miteinander vergleichen zu können,wurde eine Abwandlung der Northern-Blot Technik (Thomas 1980),die Dot-Blot Technik,benutzt,bei der gereinigte mRNA auf Nitrozellulosepapier aufgetropft (dot) wird.

Bei der verwendeten Technik (White et al. 1982) wird das Zytoplasma isoliert (siehe unten) und in einer 2er-Potenz-Verdünnungsreihe auf ein Nitrozellulosefilter BA 85 (Schleicher und Schuell) aufgetropft, um dann mit der radioaktiv markierten hu-c-myc-DNA Probe hybridisiert zu werden (siehe 2.2.14. und 2.2.15.).

Zur Zytoplasmaisolation wurden 10^7 Zellen bei 600 g abzentrifugiert,mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein steriles Eppendorfröhrchen überführt.Nach Abzentrifugation in der Eppendorfzentrifuge (5 sec) wurde das Pellet in 45 ul eiskalter TE-Puffer aufgenommen.Die Lyse der Zellen wurde durch zweimalige Zugabe von 5ul 5%iger NP-40-Lösung,unter Mischen (5 Min.) auf Eis,erreicht.Durch die sich anschließende Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge 2.5 Min.) wurden die Kerne pelletiert,so daß das Zytoplasma im Überstand in ein weiteres steriles Röhrchen überführt werden konnte (bei 0°C).Nach Zugabe von 30 ul 20xSSC und 20 ul 37%iger Formaldehyd-Lösung wurde der Zytoplasmaextrakt nun 15 Min. bei 60°C inkubiert.Danach wurden 5 ul entweder sofort für den dot-blot verwendet oder der Extrakt bei -70°C gelagert.

Puffer und Lösungen:

TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0
20xSSC : 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat

2.2.14. Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation

Die hu-c-myc DNA,die mit der RNA des Zytoplasmas RNA/DNA Hybride bilden sollte,wurde mit (alpha-^{32}P)-dCTP durch die sogenannte Nick-Translation (Rigby et al. 1977) radioaktiv markiert.

Dabei wurden 1 ug der pMC-41 DNA,3 ul 10x Mix-Puffer,3 ul 3dNTP-Lösung,100 uCi(alpha-^{32}P)-dCTP,2 ul DNase-Lösung in Eppendorfröhrchen mit Aqua bidest. auf ein Reaktionsvolumen von 27 ul gebracht.Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. bei 15°C wurden 3 ul DNA-Polymerase I dazugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 25°C über 3 Std.,bevor die Reaktion,nach Auffüllen mit Aqua bidest. auf 100 ul,durch Zugabe von 100 ul Phenol beendet wurde.Nach Durchmischen und Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge) wurde die wässrige Phase auf eine Sephadex G-50 Säule (1 cmx 50 cm),die zuvor mit TE-Puffer durchspült worden war,aufgetragen.Nachdem die Probe eingesickert war,wurde so lange TE-Puffer nachgegeben,bis die Probe die Säule passiert hatte.Dabei werden die freien Nukleotide,die langsamer laufen, von der DNA getrennt.Die DNA-haltigen Fraktionen von je 500 ul wurden in Röhrchen gesammelt und anschließend im Szintillationszähler gemessen.Die DNA,die in den frühen Fraktionen 3-5 erschien,hatte eine Aktivität von 10^7 bis $4x10^7$ cpm/ug.Sie wurde anschließend sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Kurz vor Verwendung wurde die DNA durch Kochen (3 Min.) und anschließendem Abkühlen im Eisbad in Einzelstränge zerlegt und sofort benutzt.

Puffer und Lösungen:

10x Mixpuffer : 100 mM $MgCl_2$, 700 mM Tris-HCl,0.1 M DTT, pH 7.4
3dNTP-Lösung : 100 mM dATP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP
DNase-Lösung : 10 mM $MgCl_2$, 75 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M DTT, 2 mg DNase, 50% Glycerin
von dieser Lösung wurde vor Gebrauch eine 1:1000 Verdünnung in Aqua bidest. hergestellt.

2.2.15. RNA/DNA Filterhybridisierung

Für die RNA/DNA Filterhybridisierung wurde eine Verdünnungsreihe des Zytoplasmas mit TE-Puffer hergestellt und je 5 ul davon in einer Dot-Blot Apparatur (Schleicher und Schüll) auf die,zuvor mit 20x SSC benetzte,Nitozellulose BA 85 (Schleicher und Schüll) getropft.Um die RNA an die Nitrozellulose fest zu binden,wurde der Filter in einen Vakuumofen (Haereus) bei 80°C gelegt (sog. Einbacken).Danach wurde der Filter in Plastikfolie eingeschweißt,die 15 ml Praehybridisierungspuffer enthielt.Die Praehybridisierung,bei der unspezifisch bindende Substanzen abgesättigt werden,geschah bei 42°C über einen Zeitraum von 8-20Std..

Bei der Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer durch 10 ml Hybridisierungspuffer,der 0.25 ug der radioaktiv markierten DNA enthielt,ersetzt und bei 42° C ca. 12 Std. im Schüttelwasserbad inkubiert.Nach Beendigung der Hybridisierung wurde der Filter unter sog. stringenten Bedingungen mit 0.1x SSC Lösung,die 0.1% SDS enthielt,dreimal in einem Volumen von 500 ml je 30 Min. gewaschen.

Der luftgetrocknete Nitrozellulosefilter wurde dann auf 3MM Papier (Whatman) geklebt und mit einer Klarsichtfolie bedeckt.Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm mit dem Nitrozellulosefilter in einer Verstärkerkassette bei -70°C über 3-5 Tage belichtet.Die Entwicklung des Films wurde in einem Entwicklungsbad (1 Min.) und nach kurzem Abspülen mit Wasser in einem Fixierbad (10 Min.) vorgenommen.Anschließend wurde der Film 15 Min. gewässert und an der Luft getrocknet.

Puffer und Lösungen:

TE-Puffer : siehe 2.2.12.
20x SSC : siehe 2.2.13.
Praehybridisierungspuffer : 5x SSC, 50% Formamid, 0.02% Rinder-Serumalbumin, 0.02% Ficoll,

0.02% Polyvinylpyrrolidon, 250 ug/ml Lachs-Sperma DNA (Sigma)
Hybridisierunspuffer : zu 4 Volumenteilen
Praehydridisierungspuffer wurde ein Volumenanteil 50%iges
Dextransulfat zugefügt.

2.2.16. Immuno-Blot

Für einen Immuno-Blot (Western-Blot) wurden aus ca. 10^7 Zellen unter Verwendung des Lysepuffers und zusätzlichem Proteaseschutz (100 U/ml Trasylol,1 mM PMSF) nach einer Einwirkungszeit von 3 Min. bei 0°C die Zellysate hergestellt.Nach der Ultraschallbehandlung mit 40 W über 1 Min. schloß sich eine Ultazentrifugation (Beckmann) in 50 Ti-Rotor Über 1 Std. bei 30.000 rpm und 40°C an.Der überstand wurde sofort verwendet oder bei -30°C tiefgefroren.

Von dem Lysat wurden je 60 ul unter Zugabe von 20 ul 4x Proben-Puffer zur Proteinauftrennung durch ein 10%iges PAGE (siehe 2.2.8.) eingesetzt,welche über 4 Stunden bei 150 V lief.Anschließend wurde das Gel auf einen mit Blotpuffer benetzten Nitrozellulosefilter gelegt,der zuvor zur Seitenorientierung mit Bleistift markiert war.Gel und Filter wurden nun in die Blotvorrichtung eingespannt und in die Transfer-Kammer (Bio Rad),die mit dem Blotpuffer gefüllt war,geschoben.Der Tansfer fand bei Raumtemperatur über 3 Std. und einer Spannung von 60 V statt.Danach wurde der Nitrozellulosefilter mit Puffer A,dem 10% FCS zugesetzt war,bei Raumtemperatur über Nacht abgesättigt.Am nächsten Morgen wurde der Filter in einer Petrischale mit dem jeweiligen Antikörper bei Raumtemperatur 1.5 Stunden inkubiert.Die Antikörper (Serum oder gereinigtes IgG) wurden in einer Verdünnung von 1:10000 in Puffer A mit 10% FCS in 10 ml Volumen zugesetzt.Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen,schloß sich ein Waschen des Filters mit je 2x 20 ml Ripa-Puffer und Prewash-Puffer sowie je 1x 20 ml Ripa II-Puffer und Puffer A über 10 Min. an.Zur Markierung der gebundenen Antikörper wurden nun 15 ul eines Schaf-anti-Kaninchen Antikörpers,der mit ^{125}J markiert war,mit 10 ml Puffer A ,der wiederum 10% FCS enthielt,auf den Filter

gegeben.Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 90 Min. und wurde durch den oben beschriebenen Waschvorgang beendet.Beim letzten Schritt des Waschvorgangs wurde diesmal der Puffer A durch Ripa II-Lösung ersetzt. Nach dem Trocknen an der Luft wurde der Filter auf 3MM Papier geklebt,mit Klarsichtfolie bedeckt und 3-5 Tage auf einem Röntgenfilm in einer Verstärkerkassette bei -70°C zum Anfertigen des Autoradiogramms ausgelegt.

Puffer und Lösungen:

Lysepuffer : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5% DOC, 0.5% SDS
Probenpuffer : siehe 2.2.9.
Blotpuffer : 50% Lämmli-Puffer (siehe 2.2.8.), 20% Methanol
Puffer A : 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% NaN_3, 0.25% Gelatine
Ripa-Puffer : 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% DOC, 0.1% SDS
Prewash-Puffer :1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1% NP40
Ripa II-Puffer :50 mM Tris-HCl pH 7.2

2.2.17. Indirekte Radioimmunopräzipitation

Bei der indirekten Radioimmunopräzipitation werden in einem radioaktiv-markierten Zelllysat mittels Antikörpern einzelne Proteine erkannt und gebunden.Durch die indirekte Bindung dieses Komplexes an Protein A kann der Antigen-Antikörper-Komplex präzipitiert und nachgewiesen werden.Das Protein A ist ein Zellwandbestandteil des Staphylococcus Aureus,welches besonders hohe Affinität für Antikörper aufweist.Die indirekte Radioimmunopräzipitation wurde in einem Volumen von 500 ul durchgeführt,das sich aus 200 ul des zu testenden radioaktiven Zelllysates,5 ul Serum und 295 ul Ripa-Puffer zusammensetzte.Die spezifische Aktivität des Zelllysates betrug ca, 0.5×10^6 cpm/ug Protein.Eingesetzt wurden meist 200 ug Protein pro Test.Nach 60 Min. Inkubation bei 0°C wurden 50 ul einer 10%igen Staphylococcus-Aureus-Suspension zugegeben,so daß sich während einer Inkubation von 30 Min. bei 0°C ein Immunkomplex bilden konnte.Anschließend wurde eine Sedimentation in einer Eppendorfzentrifuge durchgeführt.Der Niederschlag wurde nun nacheinander mit Ripa-, Prewash- und Ripa II-Puffer resuspendiert und abzentrifugiert,um es von unspezifischen Bindungen zu befreien.Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Staphylococcus Aureus- Immunkomplex in 30 ul Aqua bidest. und 10 ul 4x Proben-Puffer resuspendiert und auf 80°C erhitzt,um die Bindungen zwischen Staphcoccus Aureus, dem Antikörper und dem Antigen auftzubrechen.Der Staphylococcus Aureus wurde abzentrifugiert und die Proteine des Überstandes durch PAGE (siehe 2.2.8.) aufgetrennt.Um die radioaktiven Proteine des Zelllysats zu erkennen,schloß sich nach dem Trocknen des Gels auf 3MM Papier im Geltrockner (LKB) eine Autoradiographie an.Als Marker wurden ^{14}C-markierte Proteingemische (Amersham) eingesetzt.Die Proteine hatten folgende Molekulargewichte (in kD): 92.5/69/46/30/14

Puffer und Lösungen:

4xProben-Puffer : siehe 2.2.8.
Ripa-Puffer : siehe 2.2.16.
Prewash-Puffer : siehe 2.2.16.
Ripa II-Puffer : siehe 2.2.16.

2.2.18. Herstellung von Immunaffinitätssäulen

Um aus Vollserum spezifische IgG Fraktionen zu gewinnen,wurden die Peptide an CH-aktivierte Sepharose-4B (Pharmacia) gebunden,die dann in Form einer Säule zur Verfügung stand.Durch diese Säule wurde das Antiserum gepumpt.Die Serumbestandteile wurden beim Durchspülen der Säule mit PBS entfernt.Anschließend wurden die Peptid spezifischen IgGs mit 1.5 M NaSCN eluiert und gegen PBS dialysiert.Diese Peptid spezifischen IgGs dienten zur Konstruktion einer weiteren Immunaffinitätssäule.Hierbei wurden die IgG an Protein A Sepharose gebunden.Zur Isolierung des hu-c-myc Proteins wurden 10^8 Zellen der COLO 320 Linie mit ^{35}S-Methionin markiert und nach zweimaligen Waschen mit PBS lysiert (siehe 2.1.4.2. und 2.2.16.).Dieses Lysat wurde durch die Säule gepumpt.Um unspezifisch gebundene Anteile zu beseitigen,wurde die Säule ausgiebig gewaschen.Dabei wurden 50 ml Ripa-Puffer,20 ml Prewash-Puffer und 20 ml PBS verwendet.Zum Eluieren des hu-c-myc Proteins wurde dreimal 1 ml Niedrig-pH-Puffer durch die Säule gepumpt und sofort mit jeweils 300 ul Tris pH 9.2 neutralisiert.Die spezifische Aktivität des so gewonnenen Proteins betrug im Durchschnitt 20000 cpm/ug, wobei ungefähr 5 ug bei einem Isolierungsvorgang eluiert wurden.Zur Analyse in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden 60 ul der hu-c-myc Protein-Lösung eingesetzt.

Um Peptide an die CH-aktive Sepharose-4B (Parmacia) zu binden,wurde 0.4 mg Sepharose auf einer Fritte mit zweimal 50 ml einer 1 mM HCL-Lösung zur Quellung gebracht.Es folgte ein weiteres Durchspülen mit 50 ml 0.1 M $NaHCO_3$ Lösung,um die Salzsäure zu neutralisieren.0.4 mg CH-Sepharose-4B binden 6 umol des jeweiligen Peptids.Es wurden entsprechende Mengen des Peptids in 1 ml 0.1 M $NaHCO_3$ aufgenommen und über Nacht mit der ebenfalls in 1 ml 0.1 M $NaHCO_3$ Lösung suspendierten Sepharose bei 4°C unter geringem Schütteln zusammengebracht.Am nächsten Morgen wurde die Sepharose abwechselnd je viermal mit 0.05 M Tris-HCl pH 8 und 0.05 M Na-Acetat pH 5 (beides unter Zusatz von 150 mM NaCL) resuspendiert und zentrifugiert (Minifuge,5000 rpm über 5 Min.),um nicht-gebundene Bestandteile zu entfernen.Nach zweimaligem Waschen mit PBS (unter denselben Bedingungen) konnte die Sepharose in

Säulen überführt und benutzt bzw. unter Zusatz von 0.02% Methiolat bei 4°C gelagert werden.

Die Peptid spezifischen IgGs wurden kovalent an Protein A-Sepharose CL-4B gebunden.Dazu wurden 0.33 g Protein A-Sepharose CL-4B in 5 ml PBS zum Quellen gebracht.Anschließend wurde sie über 10 Min. bei 5000 rpm abzentifugiert und durch zweimaliges Waschen mit PBS gereinigt (jeweils 5000 rpm über 10 Min.).Nachdem der Überstand entfernt war,wurden 5 mg des Peptid spezifischen IgGs der Sepharose zugefügt und über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert.Die nicht-gebundenen Bestandteile wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS und zweimaliges Waschen mit Boratpuffer (5000 rpm über 10 Min.) entfernt.Um die mit dem Fc-Teil an dem Protein A haftenden IgGs kovalent zu binden,wurden 5 ml Dimethylsuberimidat-Lösung der Sepharose zugefügt.Nach einer Inkubation von 16 Stunden schloß sich ein weiterer ausgiebiger Waschvorgang an.Dazu wurden nacheinander PBS, Niedrig-pH-Puffer und dreimal PBS über jeweils 10 Min. bei 5000 rpm eingesetzt.Der Überstand wurde jeweils verworfen.Die mit dem kovalent-gebundenen IgG ausgestattete Sepharose wurde in eine Säule überführt,wurde so eingesetzt oder bei 4°C in PBS mit 0.02% Merthiolat aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

PBS :	siehe 2.2.12.
Ripa-Puffer :	siehe 2.2.16.
Prewash-Puffer :	siehe 2.2.16.
Boratpuffer :	1.38% $NaBO_3 \times 4H_2O$, 0.6% H_3BO_4 auf pH 9 eingestellt
Dimethylsuberimidatlösung	40 mg Dimethylsuberimidat in 5 ml Boratpuffer
Niedrig-pH-Puffer :	0.1 M Zitronensäure

2.2.19. DNA-Filterbindungstest

Bei dem DNA-Filterbindungstest wird das zu untersuchende Protein an einen Nitrozellulosefilter gebunden.Diesem Protein wird wird ^{3}H-Thymidin markierte DNA angeboten.Findet eine Bindung statt,so kann die radioaktiv-markierte DNA im Szintillationszähler gemessen werden.

Um radioaktiv markierte DNA zu erhalten,wurden 5x10^{7} Hühnerembryofibroblasten in 10 ml Nährmedium über 3 Std. mit 500 uCi ^{3}H-Thymidin inkubiert.Das nicht von dem Zellen aufgenommene ^{3}H-Thymidin wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt (3000 rpm über 10 Min.).Anschließend wurde die Zytoplasmamembran durch Zugabe von 10 ml Lysierpuffer und fünfmaligen Pottern bei 500 rpm zerstört.Die Zellkerne wurden bei 3000 rpm über 10 Min. abzentrifugiert und zweimal mit Saccharose-Puffer gewaschen.Nach Zugabe von 5 ml Pronase-Lösung wurden die Zellkerne über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.Am nächsten Morgen wurden 5 ml Phenol und nach 10minütigem Schütteln 5 ml Chloroform zugesetzt.Um die wässrige Phase zu gewinnen,wurde die Emulsion über 10 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert.Die wässrige Phase,die die DNA enthielt,wurde abgenommen.Dazu wurden 5 ml Chloroform- Isoamylalkohol gegeben und 10 Min. geschüttelt.Es schloß sich eine Zentrifugation bei 4°C an,wobei durch die Kälte das SDS der Pronase-Lösung ausfiel.Nach Abnahme der wässrigen Phase wiederholte sich dieser Vorgang.Die wässrige Phase wurde danach über Nacht gegen 0.1x SSC dialysiert.Dieser DNA-Lösung wurde am nächsten Tag 50 ug RNase zugefügt und 1 Std. bei 37°C belassen.Anschließend wurden 50 ug Proteinase K in 5 ml 0.5% SDS dazugegeben.Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 Std. wiederholte sich die Phenolextraktion des Vortages.Zum Abschluß wurde die DNA mit Äthanol (siehe 2.2.3.) gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.Anschließend wurde die DNA mit einer 21 G-Kanüle geschert und in dieser Form verwendet oder bei -20°C gelagert.

Der DNA-Filterbindungstest wurde mit Protein vorgenommen,das über Immunaffinitätssäulen gereinigt wurde.Die Nitrozellulosefilter (Schleicher&Schuell BA 85) wurden 5 Min. in 0.3 M NaOH

vorbehandelt und dreimal mit Aqua abgespült.In der Zwischenzeit (ca. 10 Min.) wurden Proben des Proteins (0.01 ug bis 0.1 ug) mit mit ^{3}H-markierten Hühner-DNA (10^5 cpm/ug),6.25 ul 4 M NaCl und TE-Puffer auf eine Gesamtmenge von 500 ul gebracht und bei 30°C für 10 Min. inkubiert.Die Filter wurden unter dem Sog einer Wasserstrahlpumpe mit 2 ml TE-Puffer vorgespült.Anschließend wurden die Proben mit 2 ml TE-Puffer + 50 mM NaCl verdünnt und filtriert.Die Probenröhrchen wurden mit 2 ml TE-Puffer + 50 mM NaCl nachgespült,und der Inhalt erneut filtriert.Nun wurden die Filter nacheinander mit 4 ml TE-Puffer +50 mM NaCl und zweimal mit 4 ml TE-Puffer gewaschen.Nach dem folgenden Trocknen unter Infrarot-Licht konnte die an den Filter gebundene ^{3}H-DNA unter Zugabe von 5 ml PPO-Toluol im Szintillationszähler gemessen werden.

Bei der Hemmung der DNA-Bindung des Proteins wurde es in einem Volumen von 500 ul (mit TE-Puffer eingestellt) für 10 Min. bei 0°C mit steigenden Mengen des gereinigten IgG inkubiert (ca.0.03 mg/ml).Nach Zugabe der DNA schloß sich das oben beschriebene Verfahren an.Zur graphischen Darstellung wurde der Ansatz ohne IgG als 100%ige Bindungskapazität angenommen.

Puffer und Lösungen:

Saccharose-Puffer : 0.3 M Saccharose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.15 mM Spermin, 0.5 mM Spermidin, 15 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 14 mM β-Mercaptoäthanol

Lysierpuffer : Saccharosepuffer, 0.1% Triton X-100

Pronase-Lösung : 10 mg/ml Proteinase K in Aqua bidest.

SSC : siehe 2.2.13.

TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA

2.2.20. APAAP-Färbetechnik

Mit der Färbetechnik durch Immunkomplexe von alkalischer Phosphatase und monoklonalen alkalische-Phosphatase Antikörpern (APAAP-Komplexe) konnten Antikörper,die intrazelluläre Proteine erkannten,sichtbar gemacht werden.

Die auf einem Objektträger befindlichen Präparate wurden mit dem hu-c-myc Kaninchenantiserum in einer Verdünnung von 1:500 in PBS (Volumen ca. 100 ul) bei Raumtemperatur eine halbe Stunde inkubiert.Nach zweimaligem Abspülen des Objektträgers mit Spülpuffer folgte eine sog. Mausifikation des Kaninchenantikörpers mit einem Maus-anti-Kaninchen Serum (1:2 mit Humanserum) über eine halbe Stunde.Die Inkubationzeit wurde durch weiteres Abspülen mit Spülpuffer unterbrochen,um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

Nun wurde der Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus) hinzugefügt,der innerhalb der Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur an den Mausantikörper binden sollte.Nach weiterem Abspülen des Objektträgers wurde nun der präformierte APAAP-Komplex (alkalische Phosphatase und anti-alkalische Phophatase Immunkomplexe) hinzugegeben (1 Std.,Raumtemperatur).Nach Entfernen des nicht gebundenen Komplexes mit Spülpuffer wurde das Substrat der Alkalischen Phosphatase (Naphtol-AS-BI) über 30 Min. auf dem Präparat belassen.Nach erneutem Abspülen wurde das Präparat getrocknet,mit Glyceringelatine eingebettet und unter dem Mikroskop beurteilt.

Puffer und Lösungen:

PBS : siehe 2.2.12.

TBS : 10% (0.5 M Tris-HCl pH 7.6), 90% (0.15 M NaCl)

Substrat :

Das Substrat der alkalischen Phosphatase wurde vor dem Gebrauch

frisch angesetzt.Dazu wurden 0.5 ml einer 5%igen Neu-Fuchsin-Lösung (in 2 N HCl) zu 1.25 ml einer frisch angesetzten 4%igen Na-Nitrit-Lösung zugefügt.Diese Lösung wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 8.7 Puffer,der 0.6 mg Levamisol/ml enthielt, auf ein Volumen von 150 ml gebracht.Anschließend wurden 125 mg Naphtol AS-BI (Sigma),die zuvor frisch in 1.5 ml Dimethylformamid gelöst waren, dazugegeben.Mit dieser Lösung wurden die Objektträger mit den Präparaten inkubiert.

2.2.21. Lymphozytenstimulation

Zur Isolation der Lymphozyten wurden 10 ml peripheres Venenblut mit 1 Einheit Heparin /ml versetzt,um die Gerinnselbildung zu verhindern.Es schloß sich eine Zentrifugation (1000 rpm,Minifuge) über einen Ficoll-Hypaque Gradienten an.Danach konnten die mononucleären Zellen mit einer Pasteurpipette an der Grenzschicht des Gradienten entnommen werden.Bei diesem Vorgang sedimentieren die Erythrozyten und der größte Teil der Granulozyten.Um weitere Plasmabestandteile abzutrennen,wurden die Zellen zweimal mit RPMI-1640 (Gibco) resuspendiert und abzentrifugiert (2000 rpm,Minifuge).Anschließend wurden die Zellen in 1 ml RPMi-1640 aufgenommen und in einer Zählkammer (Neugebauer) gezählt.

Zur Stimulation wurden 10^7 Zellen in 1 ml 35S-Methioninhaltigem Medium (500 uCi/ml) unter Zusatz von 20 ug Concavalin A drei Stunden inkubiert.Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS zweimal resuspendiert und abzentrifugiert (Minifuge 3000rpm,10min.)

Das Lysat der Zellen wurde durch Zugabe von 1 ml Ripa-Puffer hergestellt und bei -20°C gelagert bzw. gleich in der indirekten Radioimmunopräzipitation eingesetzt.

Puffer und Lösungen:

Ripa-Puffer : siehe 2.2.16.
PBS : siehe 2.2.12.

3.Ergebnisse

3.1.Expressionsklonierung des hu-c-myc Gens und Antikörpergewinnung

3.1.1.Klonierung des hu-c-myc Exon III in pPLc24

Das menschliche myc Protein wird in menschlichen Tumorzellen nur in sehr geringem Maße produziert.Nur etwa 0.01% der zellulären Proteine entsprechen dem myc Protein.Weiterhin ist dieses Protein nicht sehr immunogen,da es auch im normalen Organismus vorkommt.Um Antikörper gegen das myc Genprodukt herzustellen,mußte daher auf gentechnologische Hilfsmittel zurückgegriffen werden.Das hu-c-myc Gen sollte in Bakterien zur Proteinexpression einkloniert werden.Am günstigsten wäre es,dabei das ganze Gen einzuklonieren.Das dabei gebildete Protein erwies sich jedoch als instabil.Statt dessen konnte ein Teilabschnitt erfolgreich exprimiert werden.

Für die Expression des menschlichen myc Proteins in Bakterien wurde ein Expressionsvektor ausgewählt.Dieser Vektor trägt den starken Promotor der linken Seite des Genoms des Bakteriophagen Lambda (Promotor links,P_L) (Remault et al.1981).Diesem Promotor schließt sich bei dem verwendeten Expressionsvektor,pPL_c24,ein Teil eines Bakteriophagengens an.Es handelt sich dabei um einen Teil des Gens für die Replikase des Bakteriophagen MS2,das im Uhrzeigersinn (c steht für clockwise) dem Promotor (P_Lc) folgt.Dieser Genabschnitt kodiert für 99 Aminosäuren.Hinter diesem Replikasegenbereich liegen Sequenzen,die von mehreren Restriktionsendonukleasen erkannt werden und sich somit zum Einklonieren des interessierenden eukaryontischen Gens eignen (Kuepper et al.1982).Dabei gerät das einklonierte Gen in unmittelbare Nähe des MS2-Replikasegens,so daß bei der Proteinexpression ein sog. Fusionsprotein gebildet wird.Die Proteinexpression läßt sich regulieren,indem die Aktivität des Promotors gesteuert wird.Dieses geschieht durch den

Lambda-Repressor, cI ,der die Aktivität des Promotors drosselt.Als bakterieller Wirt wurde der E.coli Stamm 537 ausgewählt,der das Gen für einen Lambda-Repressor auf einem Plasmid, pcI857 ,in sich trägt.Dabei handelt es sich nicht um ein Wildtyp Lambda-Repressorgen, sondern um eine mutierte Form.Dieses mutierte Gen bildet einen thermolabilen Repressor,der bei 28°C die Aktivität des Promotors unterdrückt.Bei dieser Temperatur werden deshalb die Bakterien vermehrt.Erhöht man die Temperatur auf 42°C, die nicht-permissive Temperatur,bindet der Repressor nicht mehr an den Promotorbereich,und die Transkription der darauf folgenden Gene beginnt.Da die eukaryontischen Genprodukte oftmals für die Bakterien letal sind,beläßt man die Kulturen nur für kurze Zeit bei dieser Temperatur (z.B. für 2 Std.).Dieses Vektorsystem wurde für die Expressionsklonierung des menschlichen Proto-Onkogens hu-c-myc verwendet.

Das hu-c-myc Gen unterscheidet sich trotz der Nukleotidsequenzhomologie vom viralen v-myc Gen in der Struktur des Genoms.Das menschliche myc Gen besteht aus drei Exons,wobei das erste Exon zwar transkribiert wird,nicht jedoch für ein myc Protein kodieren kann,da in allen drei Leserahmen des DNA-Abschnittes Stopkodons auftreten (Watt et al.1983;Hamlyn and Rabbitts 1983).Dieses erste Exon besteht aus 550 bp und enthält zwei aktive Promotoren (Battey et al.1983).Die Exons II und III kodieren für ein Protein.Sie haben eine Länge von 769 bp bzw. 873 bp und sind den Exons II und III des v-myc homolog.Das v-myc ist jedoch nicht durch die für eukaryontische Gene charakteristischen Introns unterteilt.Am Beginn des hu-c-myc Exon III befinden sich Nukleotidsequenzen,die den Restriktionsendonukleasen Sal I und Cla I als Erkennungssequenzen dienen.63 bp nach dem Stop-Kodon im Leseraster des hu-c-myc Exon III folgt eine Schnittstelle für das Enzym Bcl I,welche beim v-myc nicht existiert.Ein weiterer Unterschied zwischen dem hu-c-myc Exon III und dem v-myc Exon III ist die Erkennungssequenz für das Enzym XHO II (354 bp hinter der Schnittstelle für Cla I),die im viralen Gen nicht vorkommt (siehe Abbildung 2).

Für die Expressionsklonierung wurde das Cla I-Bcl I-Fragment des hu-c-myc Exon III ausgewählt.Die menschliche DNA dieses Exons,in

das Plasmid pBR322 (Bolivar et al.1977) einkloniert,stand zur Verfügung (pMC41-3rc) (Dalla Favera et al.1982).Der Expressionsvektor pP_Lc24 war schon für die bakterielle Expression des v-myc Exon III verwendet worden.Dabei war ein Sal I-Bam H I-Fragment benutzt worden(p-myc 5/30Sal)(Bunte et al.1984).Aus diesem Vektor wurde ein Cla I-Bam H I-Fragment des v-myc Gens herausgeschnitten und durch ein Cla I-Bcl I-Fragment des hu-c-myc Gens ersetzt.Dieses gelang,da die Enzyme Bam H I und Bcl I Isoschizomere sind.Dabei wurde in Kauf genommen,daß von dem neu konstruierten Plasmid, p-myc 6/4 genannt,20 der 198 Aminosäuren des hu-c-myc Exon III weiterhin vom v-myc Gen kodiert wurden (siehe Abbildung 2).

Um die Richtigkeit der Klonierung zu beweisen,wurde die XHO II-Schnittstelle des hu-c-myc Gens herangezogen.Diese Schnittstelle kommt,wie oben erwähnt,nur im Exon III des hu-c-myc Gens vor.In p-myc 6/4 und pMC41-3rc sollte deshalb ein 354 bp beinhaltendes Fragment bei einem Enzymverdau mit Cla I und XHO II entstehen,das bei dem Plasmiden des v-myc (p-myc 5/30Sal) fehlen mußte.Das Ergebnis dieses Experiments zeigt die Abbildung 2.Die DNA-Fragmente sind in einem Agarosegel aufgetrennt.In Reihe 1 (pMC41-3rc) und Reihe 2 (p-myc 6/4 erscheint im Bereich von 350 bp die erwartete DNA-Bande (Pfeil).In Reihe 3 wurde ein Kontrollplasmid mitgeführt.Die Länge des Fragmentes im Bereich von 350 bp beträgt hier 393 bp.In Reihe 4 (p-myc 5/30Sal kommt in diesem Bereich keine DNA-Bande vor.Da dieses Plasmid das v-myc Gen trägt,war aufgrund der Nukleotidsequenz auch kein DNA-Fragment dieser Größe zu erwarten.

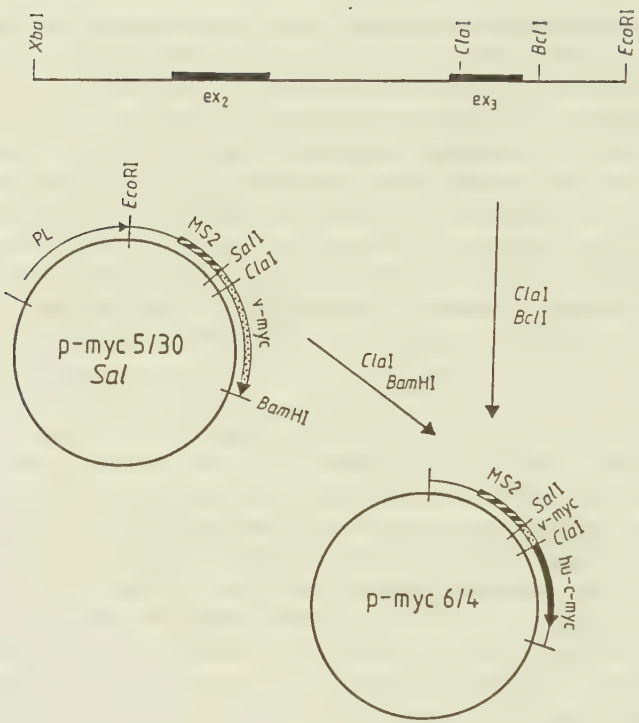

Abbildung 1

Klonierung des hu-c--myc Exon III in $pP_{Lc}24$

Die schematische Darstellung zeigt die Einklonierung der hu-c-myc Exon III-DNA in $pP_{Lc}24$,der das Exon III des v-myc Gens trägt.Die Exons II und III des hu-c-myc Gens sind durch schwarze Balken hervorgehoben.

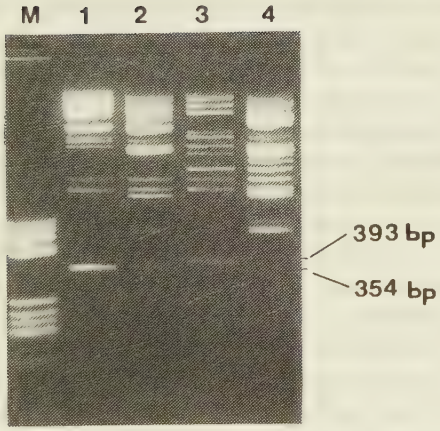

Abbildung 2

Beweis der Richtigkeit der Klonierung

DNA Enzymverdau mit Cla I und XHO II

Reihe 1 : pMC41-3rc Reihe 2 : p-myc 6/4

Reihe 3 : Kontrollplasmid Reihe 4 : p-myc 5/30Sal

(Erläuterungen im Text)

3.1.2.Isolierung des MS2-hu-c-myc Fusionsproteins aus Bakterien

Um zur Immunisierung von Kaninchen möglichst reines MS2-hu-c-myc Fusionsprotein zu gewinnen,fanden zwei Verfahren zur Proteinanreicherung aus Bakterien Anwendung.Zuerst wurden Bakterien des E.coli-Stammes 537,die den Expressionsvektor p-myc 6/4 trugen,durch Temperaturerhöhung zur Proteinsynthese angeregt (siehe 2.2.9.).Die induzierten Bakterien wurden anschließend mit SDS-haltigem Puffer lysiert,kurz mit Ultraschall behandelt,um die DNA zu zerkleinern.Daraufhin wurden die Proteine dieses Bakterienlysats auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.Aus diesem Gel sollte die MS2-hu-c-myc Proteinbande möglichst so isoliert werden,daß das Protein dabei nicht denaturiert wird.Deshalb wurden nur links und rechts zwei Streifen des Gels abgeschnitten und diese mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt.Anhand der sichtbaren Banden war das MS2-hu-c-myc Protein erkennbar,da es einerseits das bei weitem das am stärksten produzierte Protein darstellte und somit die dickste Bande repräsentierte.Andererseits konnte seine Größe mit Hilfe von Molekulargewichtsmarkern nachgeprüft werden.Um bei der Identifizierung des Proteins sicher zu gehen,wurden zum Vergleich auch Lysate von nicht-induzierten Bakterien auf das Polyacryamidgel aufgetragen.Die Proteine dieser Lysate,die das MS2-hu-c-myc Protein nicht verstärkt enthalten,wurden ebenfalls auf den seitliche Gelstreifen mitangefärbt.Nach dieser Identifizierung wurde das MS2-hu-c-myc Protein als horizontaler Streifen aus dem Gel herausgeschnitten mit einem Glashomogenisator zermörsert.Zugabe von PBS und leichtes Schütteln bei Zimmertemperatur gestattete in einigen Stunden eine fast vollständige Elution des Proteins aus dem Gel.Die Endkonzentration,die hierbei erreicht wurde,betrug etwa 1 mg/ml.

Das zweite Verfahren zur Anreicherung des MS2-hu-c-myc Proteins bestand darin,die schlechte Löslichkeit des bakteriell-expremierten Fusionsproteins in wässrigen Lösungen auszunutzen.Fast alle anderen Proteine lösen sich leichter.Die Isolierung des MS2-hu-c-myc Proteins erfolgte dabei über folgende Schritte: zuerst wurden die thermoinduzierten Bakterien mit dem

Lysepuffer lysiert (siehe 2.2.9.) ,und die DNA durch eine Ultraschallbehandlung zerkleinert.Diesem Bakterienlysat wurde ein detergenzhaltiger (Triton x-100) Puffer zugefügt,um weitere Zellbestandteile zu lösen.Die unlöslichen Anteile wurden abzentrifugiert.Durch Zugabe einer 1 M Harnstofflösung konnten weitere Bestandteile des bei der Zentrifugation entstandenen Niederschlags gelöst werden.Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die nunmehr schon gering gewordenen ausgefallenen Anteile mit der detergenzhaltigen Lösung gewaschen.Das dabei entstandene Pellet wurde daraufhin mit einer 7 M Harnstofflösung vollständig in Lösung gebracht.Die Abbildung 3 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel,in dem die in den jeweiligen Lösungsmittel gelösten Proteine dargestellt sind.In dem Lysat der bei 42°C thermoinduzierten Bakterien (Reihe 2) ist das Fusionsprotein,das weiter angereichert werden soll,in der mit -MS2-myc gekennzeichneten Laufhöhe zu erkennen.Es fehlt in den Lysaten der nicht-induzierten Bakterien (Reihe 1).In den folgenden Reihen sind die Proteine dargestellt,die sich im Lysepuffer (Reihe 3),in der Triton X-100-haltigen Lösung (Reihe 4) und in 1 M Harnstofflösung (Reihe 5) lösen.Unter diesen Proteinen befindet sich nicht das MS2-hu-c-myc Fusionsprotein,jedoch fast alle bakteriellen Proteine.Das Fusionsprotein tritt erst in Reihe 6 auf,wobei hier als Lösungsmittel eine 7 M Harnstofflösung angewendet wurde.Die meisten anderen Proteine waren schon entfernt.Diese 7 M Harnstofflösung wurde gegen PBS dialysiert.Dabei blieb ein Teil des MS2-hu-c-myc Proteins in Lösung,ein Teil fiel allerdings auch wieder aus.Bei diesem Verfahren wurden ebenfalls Konzentrationen des gelösten Fusionsproteins von 1 mg/ml erzielt.

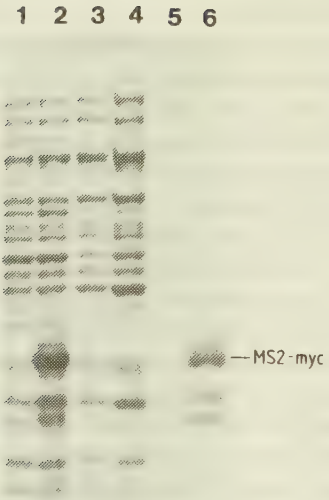

Abbildung 3

Isolierung des MS2-hu-c-myc Proteins aus Bakterien

In Reihe 1 ist ein Bakterienlysat von nicht-induzierten Bakterien des Stammes 537 mit p-myc 6/4 dargestellt.Reihe 2 zeigt ein Lysat nach Induktion der Bakterien.Diese Lysate wurden mit 4xProbenpuffer hergestellt.In Reihe 3 sind die Proteine zu erkennen,die sich im Lysepuffer lösten.In Reihe 4 wurde 10%iges Triton X-100 ,in Reihe 5 1 M Harnstofflösung und in Reihe 6 7 M Harnstofflösung als Lösungsmittel verwendet.

3.1.3.Synthetische Peptide

Ein anderer Weg,als der über die gentechnologische Klonierung,kann neuerdings beschritten werden,um Antikörper gegen Proteine zu gewinnen,deren Nukleotidsequenz bekannt ist.Die Nukleotidsequenz kann aufgrund des genetischen Kodes in die Aminosäuresequenz übersetzt werden.Daraus lassen sich kurze Aminosäure-Stücke vollsynthetisch herstellen.Bei einer geeigneten Wahl dieser Abschnitte und Verwendung zur Immunisierung können die gewonnenen Antikörper das als Antigen fungierende,synthetische Peptid erkennen und damit das gesamte Proteinmolekül,aus der die Peptidsequenz stammt.Die Auswahl der immunogenen Bereiche erfolgt über Computeranalysen,die z.B. von Doolittle und Nishikawa aufgestellt wurden(Kyte and Doolittle 1982;Nishikawa et al.1983).Die Grundlage dieser Analyse besteht darin,einer Aminosäure aufgrund der Polarität und des Einflusses benachbarter Aminosäuren einen hydrophilen oder hydrophoben Charakter zuzuordnen (siehe Abbildung 4).Die hydrophilen Bereiche,unterhalb der jeweiligen Mittellinien, sind vermutlich für immunologische Reaktionen im Tier von entscheidener Bedeutung und deshalb besonders immunogen.Die Carboxyl-terminalen Aminosäuren eines Proteins,die fast immer einen hydrophilen Charakter haben,scheinen leicht eine Immunantwort zu provozieren.Die Synthese der ausgewählten Proteinabschnitte,etwa 10-20 Aminosäuren beinhaltend,erfolgt nach der kürzlich mit dem Nobelpreis ausgezeichneten Festphasensynthese nach Merrifield (Merrifield 1963).Solche Peptide sind kommerziell erhältlich.Da die Peptide aufgrund ihres relativ niedrigen Molekulargewichts einem Hapten entsprechen,werden sie vor der Immunisierung mit einem Träger (Carrier) verbunden.In diesem Fall wurde als Träger das Keyhole Limpet Hemocyamine (KLH) eingesetzt.

Um nach diesem Verfahren Antikörper gegen das menschliche c-myc Protein zu erhalten,wurden zwei synthetische Peptide benutzt.Ein 16 Aminosäuren umfassendes Peptid,C16 genannt,entstammt der schon in der Einleitung erwähnten Cla I-Region des hu-c-myc Gens.Diese Aminosäuresequenz liegt im Zentrum des hu-c-myc Proteins.Das zweite Peptid,C12,entspricht dem Carboxyl-Ende des Proteins.Nur

dieses C12-Peptid war imstande,selbst Antikörperbildung im Tier hervorzurufen,allerdings erst nach häufigen Immunisierungen.Das C16-Peptid wurde deshalb auf eine andere Art genutzt.Es wurde an eine feste Phase (aktivierte CH-Sepharose) gekoppelt.So war es in der Lage,die Immunglobuline eines Polyvalentserums zu binden,das durch Immunisierung mit dem klonierten MS2-hu-c-myc Fusionsprotein gewonnen war.Dabei wurden nur die Immunglobuline selektioniert,die sich gegen den C16-Proteinabschnitt richteten (auf dieses Verfahren wird unter 3.1.4. genauer eingegangen).Dieses C16-Peptid spezifische IgG wurde in späteren Experimenten (siehe unten) eingesetzt.

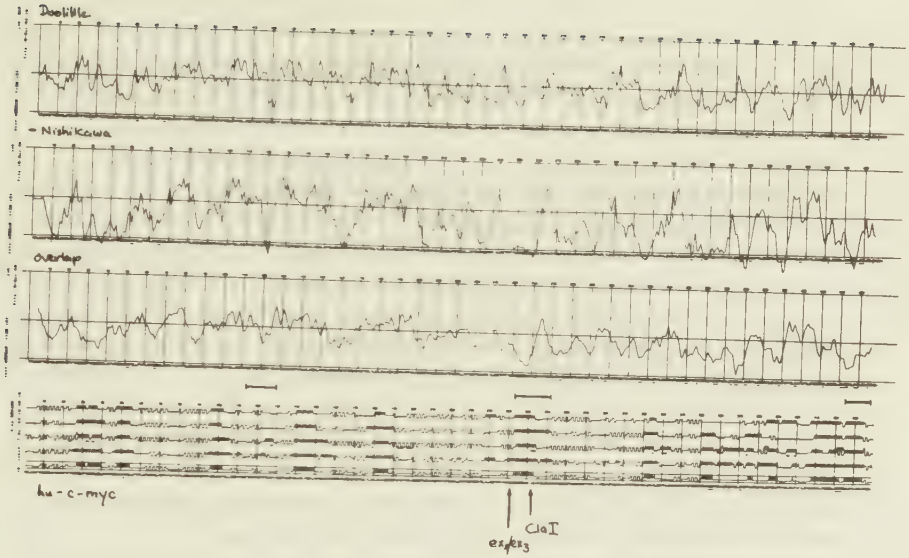

Abbildung 4

Hydrophilizitätskurven des hu-c-myc Proteins

Es sind drei Hydrophilizitätskurven dargestellt.Hydrophilizität liegt jeweils in den Bereichen der Kurve oberhalb der Mittellinie vor.Die untere Kurve (overlap) ist mit einem Computerprogramm erstellt worden,bei dem sich die Programme von Doolittle (oben) und Nishikawa (Mitte) überlappen.Im unteren Teil der Abbildung ist die Sekundärstruktur,die ebenfalls mit den Computerprogrammen berechnet wurde,wiedergegeben.

⎍⎍ bedeutet beta-Faltblatt-Struktur

⩙⩙ bedeutet alpha-Helix-Struktur

3.1.4.Gewinnung der Antiseren und Isolierung von Immunglobulinen durch Immunaffinitätschromatographie

Mit den Anteilen des hu-c-myc Proteins,die gentechnologisch (siehe 3.1.1.) oder synthetisch hergestellt waren,sollte in zwei Kaninchen (Nr.1256 und 1257) eine Immunantwort hervorgerufen werden.Da das hu-c-myc Protein,wie schon erwähnt,nicht sehr immunogen ist,war für die Immunisierung der Kaninchen die relativ hohe Antigenmenge von 250ug/pro Tier notwendig.Ab der zweiten Injektion wurde den Kaninchen bei jeder Immunisierung ca.10-20 ml Blut entnommen.Das daraus gewonnene Serum wurde auf Antikörper gegen das MS2-hu-c-myc Fusionsprotein im Immunoblot (siehe 2.2.16. und 3.2.2.) mit dem Antigen getestet.Nach der dritten Blutentnahme reagierte das Serum mit dem Antigen positiv.

Mit Hilfe dieser Antikörper sollte über Immunaffinitätschromatographie das menschliche c-myc Protein gereinigt werden.Für den Bau einer Immunaffinitätssäule werden die spezifischen IgGs benötigt,die ungefähr 5-10% des Hyperimmunserunms ausmachten.Um diese IgGs aus dem Vollserum herauszuholen,wurden sie an das Antigen gebunden.Dazu wurden das Antigen (MS2-hu-c-myc Protein) oder Teile des Antigens (C16- und C12-Peptid) an aktivierte Sepharose gekoppelt (siehe 2.2.18.).Nach Zugabe des Antiserums konnten sich hier immobilisierte Antigen-Antikörper- Komplexe ausbilden und unspezifische Antikörper durch Waschen entfernt werden.Danach konnten diese Komplexe mit Natriumrhodanid gelöst und die spezifischen Immunglobuline gewonnen werden.

3.2.Charakterisierung des hu-c-myc Genproduktes

3.2.1.Auswahl der Zellinie COLO320 zur Identifizierung des hu-c-myc Genproduktes

Mit den hochgereinigten myc-spezifischen Immunglobulinen sollte das Genprodukt des hu-c-myc aus Tumorzellen näher charakterisiert werden.Dazu sollte eine Zellinie ausgewählt werden,die das myc Protein in großer Menge exprimiert.Ein guter Anhalt für eine starke Proteinbildung einer Zelle ist ihr Gehalt der zytoplasmatischen myc-spezifischen RNA (White et al.1982).Der myc RNA-Gehalt kann mit ^{32}P-radioaktiv-markierter DNA gemessen werden.Diese DNA dient dabei als Sonde,um im isolierten Zytoplasma die ihr komplementäre RNA zu entdecken und DNA/RNA-Hybride zu bilden.Die im DNA/RNA-Hybrid gebundene ^{32P}-DNA kann dann durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

Mit dieser sog. RNA-Dot-Blot Technik wurden vier menschliche Zellinien,vier virusinfizierte Hühnerzellinien und eine Mäusezellinie miteinander verglichen.Letztere,P3X, entstammt einer Mausplasmozytomzellinie.Bei den humanen Zellinien handelte es sich um die Burkitt-Lymphomlinie Raji,die Kolonkarzinomlinie COLO 320,die Zervixkarzinomlinie Hela und die Promyelozytenleukämielinie HL-60.Die HL-60 Zellinie wurde mit DMSO zur Differenzierung zu Metamyelozyten gebracht (Westin et al.1981),deren Zytoplasma ebenfalls untersucht wurde.Bei den virusinfizierten Hühnerzellinien handelte es sich um Q8MC29-Zellen,die von dem Virus MC29 befallen ist.Q10H ist eine Zellinie,die von dem gleichnamigen Virus,einer Mutante des MC29,infiziert ist.Die Rückmutante,HB-1,wird von der Zellinie HB-1 getragen.QEF-Zellen sind von dem Virus MH2 befallen.Das Zytoplasma dieser Zellen wurde in einer Zweierpotenz-Verdünnung auf den Nitrozellulosefilter getropft.Als DNA-Sonde diente pMC41,ein pBR322 Plasmid,in das das gesamte hu-c-myc Gen einkloniert ist.Diese DNA wurde durch Nick-Translation (2.2.14.) radioaktiv markiert.Nach dem Hybridisierungsvorgang wurde der Filter unter sog. stringenten Bedingungen gewaschen,d.h. es wurde ein Puffer

mit niedrigem Salzgehalt bei erhöhter Temperatur verwendet.Bei diesen Waschbedingungen lösen sich vorzugsweise diejenigen RNA/DNA-Hybride,bei denen Sequenzunterschiede vorkommen.Da mit menschlicher myc DNA hybridisiert wurde,mußte deshalb mit einer Reduktion der Hybridisierungeffizienz bei RNA aus nicht-menschlichen Zellen gerechnet werden.

Das Autoradiogramm (Abbildung 5) zeigt bei den Tumorzellinien COLO 320 und Hela auch in den höheren Verdünnungen noch eine deutliche Hybridisierung.Raji-Zellen und die beiden HL-60 Zellinien haben einen niedrigeren myc RNA Gehalt.Die Mäusemyelomzellinie P3X zeigt einen myc-spezifischen RNA Gehalt,der ,trotz der Sequenzunterschiede, mit dem der Zellinie Hela zu vergleichen ist.Die virusinfizierten Hühnerzelllysate,die zur Kontrolle mitgeführt waren,wiesen alle einen sehr hohen myc RNA Gehalt auf,wobei der myc-Anteil in den HB-1 Zellen am größten war.Dieses Ergebnis entsprach früher gemachten Beobachtungen.

Für die weiteren Versuche wurde aufgrund dieses Tests die Kolonkarzinomlinie COLO 320 ausgewählt.

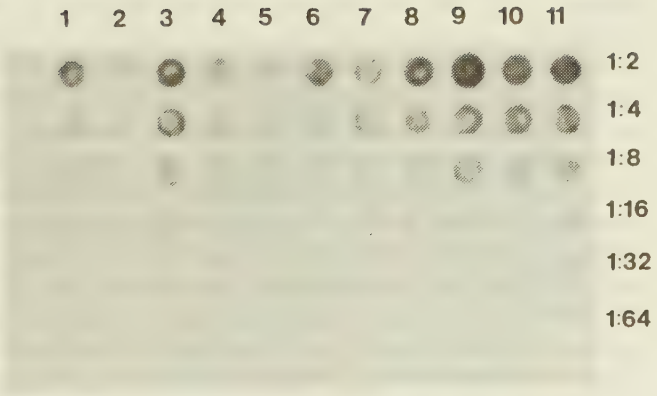

Abbildung 5

Dot-Blot zur Darstellung der myc spezifischen mRNA

Die Zelllysate sind jeweils in 2er-Potenz Schritten verdünnt.Folgende Zelllysate wurden aufgetragen:QEF (Reihe 1), normale Lymphozyten (Reihe 2), HB-1 (Reihe 3), Q8MC29 (Reihe 4), Q10H Reihe 5), P3X (Reihe 6), Raji (Reihe 7), Hela (Reihe 8), HL-60 induziert (Reihe 9),HL-60 (Reihe 10) und COLO320 (Reihe 11).

3.2.2. Identifizierung des hu-c-myc Genproduktes

Zur Identifizierung des menschlichen,zellulären myc Genproduktes wurden zwei verschiedene Testsysteme eingesetzt.Dieses waren der Immunoblot und die Radioimmunopräzipitation.Für beide Verfahren wurden Zellen der proliferativen Phase verwendet.

Beim Immunoblot wird das aus den Zellen hergestellte Lysat einer SDS-Polyacylamid-Gelelektrophorese ausgesetzt,wobei die Zellproteine nach der Größe aufgetrennt werden.Die Proteine werden aus diesem Gel elektrophoretisch aus ein Nitrozellulosefilter übertragen (blotting).Hier können die Proteine mit spezifischen Antikörpern (sog. erster Antikörper) immobilisierte Komplexe bilden.Diese werden durch einen zweiten Antikörper,in diesem Fall mit ^{125}J markiert, nachgewiesen.Für die hu-c-myc Protein-Identifizierung wurden das gut charakterisierte v-myc Protein in einem Q8-MC29-Zelllysat und das hu-c-myc Protein in einem COLO 320-Zelllysat eingesetzt.Als erster Antikörper fungierte das C16-Peptid spezifische Immunglobulin (siehe 3.1.4.).Das Ergebnis des Immunoblots zeigt die Abbildung 6.Das C16-Peptid spezifische Immunglobulin reagierte sowohl mit dem COLO 320-Zelllysat,als auch mit dem Q8-MC29-Zelllysat.Das bekannte p gag-myc. ist deutlich sichtbar.Bei den menschlichen Zellen wurde von den Immunglobulinen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 64 kD,p64,erkannt.Über dieser p64-Bande wurde eine schwächere,zweite Bande mit ungefähr 66 kD nachgewiesen.

Weiterhin wurde die Methode der indirekten Radioimmunopräzipitation eingesetzt.Diese Methode besteht darin,radioaktiv-markierte Proteine immunologisch nachzuweisen.Dazu werden die Proteine von Zellen <u>in vitro</u> mit 4 mit ^{35}S-Methionin markiert.Zu dem Lysat dieser Zellen wird das Antiserum bzw. die Immunglobuline zugesetzt.Die dabei entstehenden Antigen-Antkörper-Komplexe werden über den Fc-Teil der IgGs an das Protein A des Staphylcoccus Aureus gebunden und können zusammen mit den Bakterien durch Zentrifugation gewonnen werden.Dieser Gesamtkomplex,aus Antigen, Antikörper und Staphylococcos Aureus,wird unter Hitzezufuhr wieder in seine Bestandteile zerlegt

und elektrophoretisch aufgetrennt.Die radioaktiv-markierten Proteine können dann autoradiographisch dargestellt werden.Das Autoradiogramm des Versuchs zur Identifizierung des hu-c-myc Genprodukts zeigt Abbildung 7.Dabei wurden Lysate von Q8-MC29-Zellen und von COLO 320-Zellen miteinander verglichen.Im Gesamtansatz des Radioimmunopräzipitationstest wurden mehrere Antiseren des Labors verglichen.Es zeigte sich,daß die Antikörper gegen das bakteriell expremierte hu-c-myc neben dem menschlichen - ebenso das virale myc Genprodukt (jeweils Reihe 3) erkennen.Umgekehrt erkennen die Antikörper gegen das bakteriell expremierte v-myc ebenfalls das menschliche c-myc Genprodukt als 64 kD Protein,wenn auch sehr schwach (jeweils Reihe 4).Auch das C16-Peptid spezifische IgG weist Kreuzreaktivität mit beiden Proteinen auf und präzipitiert v-myc und c-myc Genprodukte.Dabei zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen C16-Peptid spezifischen IgG isoliert aus Vollserum gegen v-myc Protein oder isoliert aus Vollserum gegen hu-c-myc Protein (jeweils Reihe 5 und 6).Von einem Antiserum,das durch Immunisierung mit an KLH gekoppeltem C12-Peptid gewonnen war und in diesem Fall von einer frühen Blutung stammte,wurde jedoch kein myc Protein präzipitiert (jeweils Reihe 7).Wurde C12-Peptid spezifisches IgG aus Vollserum gegen das hu-c-myc Protein isoliert,so war dieses IgG imstande,sowohl das v-myc -,wie auch das hu-c-myc Protein zu erkennen.Ein weiteres Peptidantiserum,welches gegen die 9 Aminosäuren des Carboxyl-Endes des viralen myc Genprodukts gerichtet war,erkannte nur das myc Protein in Q8MC29,nicht aber bei COLO 320 (jeweils Reihe 9).Zur Kontrolle wurden ein Normalserum (jeweils Reihe 1) und ein Antiserum gegen das MS2-Protein (jeweils Reihe 2) mitgeführt.Beide präzipitierten,wie erwartet,kein myc Protein.

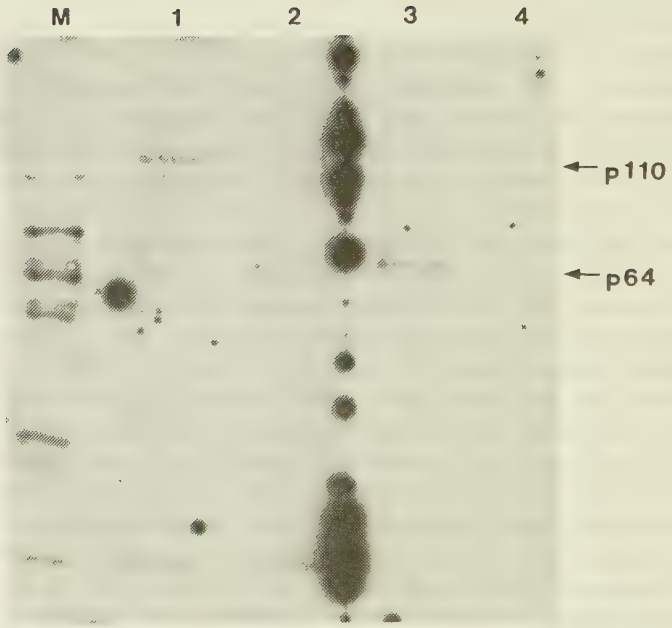

Abbildung 6

Immunoblot zur Darstellung des hu-c-myc Proteins

In Reihe 1,2 und 4 sind Q8MC29 Zelllysate,in Reihe 3 ein COLO320 Zelllysat aufgetragen.Als Antikörper wurde das C16-Peptid spezifisches IgG verwendet.Die Laufhöhe des v-myc Proteins ist mit p110,die des hu-c-myc Proteins mit p64 gekennzeichnet.

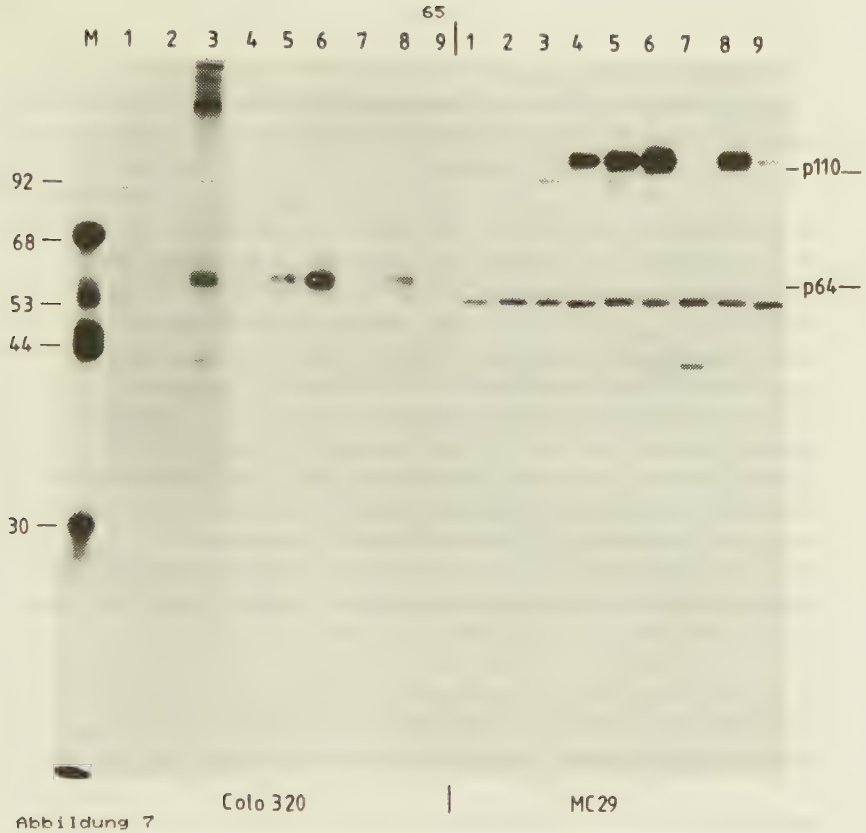

Abbildung 7

Indirekte Radioimmunopräzipitation des hu-c-myc und des v-myc Proteins

Auf der rechten Bildhälfte sind Lysate der Zellinie Q8MC29,auf der linken Bildhälfte Lysate der Zellinie COLO320 aufgetragen.Folgende Antikörper wurden benutzt:Normalserum (jeweils Reihe 1), Antiserum gegen MS2-Protein (jeweils Reihe 2), Antiserum gegen MS2-hu-c-myc Protein (jeweils Reihe 3), Antiserum gegen MS2-v-myc Protein (jeweils Reihe 4), C16-Peptid spezifisches IgG aus MS2-v-myc Protein Antiserum isoliert (jeweils Reihe 5), C16-Peptid spezifisches IgG aus MS2-hu-c-myc Protein Antiserum isoliert (jeweils Reihe 6), C12-Peptid Antiserum (jeweils Reihe 7), C12-Peptid spezifisches IgG aus MS2-hu-c-myc Protein Antiserum isoliert (jeweils Reihe 8) und Peptidantiserum gegen das Carboxyl-Ende des v-myc Genproduktes.

3.2.3.Reinigung des hu-c-myc Genproduktes mittels Immunaffinitätschromatographie

Um die Funktion des hu-c-myc Genproduktes studieren zu können,war es notwendig das myc Protein zu reinigen.Die Reinigung eines Proteins,das in nur geringer Menge in menschlichen Zellen vorkommt,gestaltet sich als sehr schwierig.In diesem Falle wurde eine Immunaffinitätssäule konstruiert.Dabei wurden die C16-Peptid spezifischen IgGs (siehe 3.1.4.) an Protein A-Sepharose gekoppelt.Diese Verbindung wurde anschließend in eine Säule überführt,durch die ein Zelllysat gepumpt wurde.Die in der Säule immobilisierten Immunglobuline binden dabei aus dem Zelllysat das zugehörige Antigen,das hu-c-myc Genprodukt.Darafhin wird die Säule mit Puffer gewaschen,um unspezifische Zellproteine zu entfernen.Durch Zugabe eines Puffers mit niedrigem pH-Wert läßt sich anschließend die Antigen-Antikörper-Bindung lösen.Auf diese Weise wurde das hu-c-myc Protein isoliert.

Um die Reinigung zu dokumentieren und einen Maßstab für die Quantität und Qualität zu erhalten,wurden radioaktiv markierte Zellproteine verwendet.Sowohl Anteile der Proteine,die die Säule durchlaufen,ohne gebunden zu werden,als auch Anteile der durch dreifaches Eluieren gewonnenen Proteinfraktionen,die an die Antikörper binden,wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert.Dabei wurde von jeder Fraktion ein Anteil von 10% des Gesamtvolumens aufgetragen.Das Autoradiogramm zeigt Abbildung 8.Der Durchlauf der Säule (f.t.) zeigt die Menge und Vielfalt der nicht-gebundenen Proteine des Zelllysats.Die eluierten Fraktionen (#1,2,3) lassen dagegen nur noch eine Proteinbande erkennen.Mit diesen Fraktionen konnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Abbildung 9 faßt den gesamten experimentellen Ansatz,der zur Isolierung des hu-c-myc Proteins führte,noch einmal zusammen.Links wird die Expressionsklonierung symbolisch angedeutet,in der Mitte wird das bakteriell expremierte MS2-hu-c-myc Protein im Vergleich zu den übrigen bakteriellen Proteinen im SDS-Polyacryamidgel gezeigt und rechts werden die immunaffinitätschromatographischen

Reinigungen erst des C16-Peptid spezifischen IgGs und dann des hu-c-myc Proteins angedeutet.Das isolierte hu-c-myc Protein wird dann schematisch in der SDS-Polyacryamid Gelelektrophorese dargestellt.

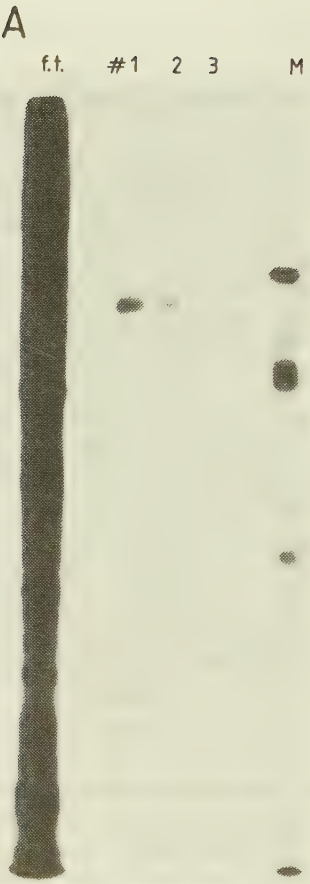

Abbildung 8

Isolierung des hu-c-myc Proteins durch
Immunaffinitätschromatographie

In der Reihe f.t. ist der Durchlauf der nicht gebundenen Proteine aufgetragen. # 1,2 und 3 bezeichnet die Fraktionen, die nacheinander von der Säule eluiert werden konnten.
M: Molekulargewichtsmarker (69000 D, 53000 D, 46000 D, 30000 D)

Abbildung 9

Zusammenfassende Darstellung der hu-c-myc Proteinisolierung

3.2.4.Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit in vitro

Das hu-c-myc Protein läßt sich bei indirekter Immunfluoreszenz im Kern nachweisen und verhält sich damit analog zum v-myc Protein (Mölling et al.1984).Da das v-myc Protein in vitro ein DNA-Bindungsprotein ist (Donner et al.1983),lag es nahe,diese Eigenschaft auch beim hu-c-myc Genprodukt zu vermuten. Aus praktischen Erwägungen wurde der Filterbindungstest zur Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit in vitro des hu-c-myc Proteins ausgewählt siehe (2.2.19.).Das Prinzip dieses Tests besteht darin,dem zu untersuchenden Protein radioaktiv-markierte DNA anzubieten.Es handelt sich dabei um doppelsträngige DNA,die ,um einzelne Fragmente zu erhalten,geschert wird.Gewonnen wird diese DNA aus eukaryontischen Zellen,denen ^{3}H-Thymidin zugesetzt wird.Das ^{3}-Thymidin wird von den Zellen metabolisiert und in DNA eingebaut.Anschließend wird die DNA isoliert.Bindet das zu untersuchende Protein an diese DNA,so wird diese indirekt über das Protein an einem Nitrozellulosefilter festgehalten und kann im Szintillationszähler nachgewiesen werden.Dieser Test ist in den hier betrachteten Proteinmengen linear.Dardurch werden die Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen optimal.

Bei dem Test wurden das virale - und das menschliche myc Genprodukt untersucht.Dabei wurden diese Proteine nach Isolierung über Immunaffinitätssäulen (siehe 3.2.3.) miteinander verglichen.Das Ergebnis zeigt die Abbildung 10 A.Auf der Ordinate sind die Meßwerte der Radioaktivität der ^{3}H-DNA aufgetragen,die Abszisse gibt die Proteinmengen an.Beide Proteine binden etwa mit der gleichen Effizienz.Damit war bewiesen,daß es sich beim hu-c-myc Protein ebenfalls um ein DNA-Bindungsprotein handelt.

Es sollte nun versucht werden,die DNA-Bindungsregion des hu-c-myc Proteins näher einzugrenzen.Dazu wurden Immunglobuline eingesetzt,die nur einen kleinen Bereich des ganzen Proteins erkennen und sich an diesen binden.Dadurch wird die Funktion dieser Proteinregion stark eingeschränkt.Bei diesen Untersuchungen wurden dem gereinigten hu-c-myc Protein verschiedene Immunglobulinfraktionen zur Hemmung der DNA-Bindung zugesetzt,bevor der Filterbindungstest durchgeführt wurde (siehe

2.2.29.).Neben normalen Immunglobulinen (normal IgG) wurden dabei Immunglobulinfraktionen verwendet,die aus Vollserum gewonnen wurden. hu-c-myc IgG und v-myc IgG waren mit Hilfe des jeweiligen Antigens,also MS2-hu-c-myc Protein und MS2-v-myc Protein,unter Verwendung von Immunaffinitätssäulen gereinigt worden.Das C16-spezifische IgG (C16-huIgG) war mit Hilfe des C16-Peptids isoliert worden.Das C12-IgG war mit Hilfe des C12-Peptid gewonnen worden (siehe 3.1.3.).Das Resultat des Experiments zeigt Abbildung 10 B.Die Ordinate gibt an,welcher Prozent der radioaktiv markierten DNA auf dem Filter zurückgehalten wird.Dabei entspricht die DNA-Menge die das hu-c-myc Protein ohne Zusatz von Immunglobulinen zurückhält dem 100%-Wert.Die Abszisse zeigt die Menge des eingesetzten Immunglobulins.Besonders auffällig verhielten sich die IgG-Fraktionen,die die C16-Region des Proteins erkannten.Sie vermochten,genauso wie die Immunglobulinfraktionen,die über das klonierte Exon III des hu-c-myc bzw.das Exon III des v-myc Genprodukt gereinigt waren,die DNA-Bindung stark zu unterdrücken.Dieses Phänomen war beim v-myc Protein schon früher beschrieben (Bunte et al.1984).Wie erwartet wurde von den C12-Peptid spezifischen IgGs die DNA-Bindung des hu-c-myc Proteins nicht gehemmt.Demnach ist die Carboxyl-terminale Region des hu-c-myc Proteins an der DNA-Bindung wahrscheinlich nicht beteiligt.

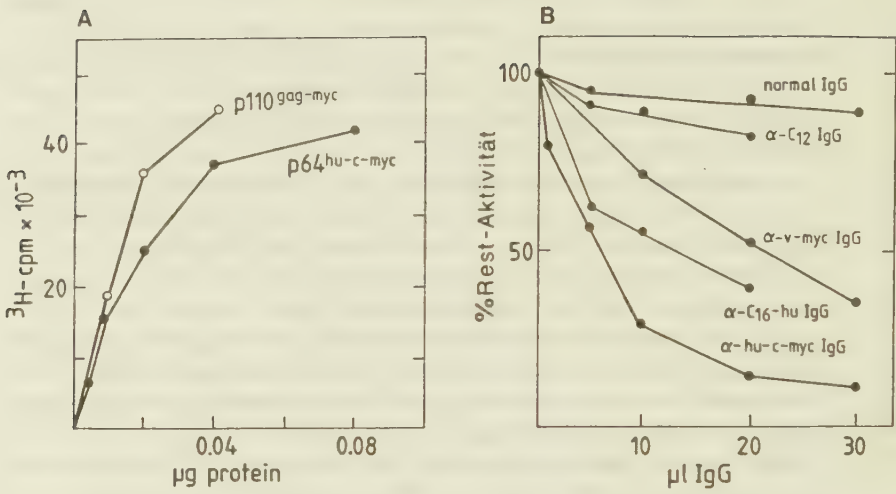

Abbildung 10 A

Filterbindungstest

Die Ordinate gibt die Werte der gemessenen Radioaktivität der mit ^{3}H-Thymidin markierten DNA wieder.Die Abszisse zeigt die eingesetzte Menge Protein.o symbolisiert das v-myc Protein aus Q8MC29, • symbolisiert das hu-c-myc Protein aus COLO320.

Abbildung 10 B

Inhibition der DNA-Bindung

Die Ordinate gibt den Prozentsatz an,der nach der Inhibition durch Antikörper gemessen wurde,wobei der 100%-Wert der DNA-Bindung des hu-c-myc Proteins ohne Zusatz von Antikörpern entspricht.Folgende Antikörper wurden verwendet:Normales IgG, C12-Peptid spezifisches IgG und C16-Peptid spezifisches IgG (beides aus MS2-hu-c-myc Antiserum),anti-hu-c-myc IgG (aus MS2-hu-c-myc mit dem Antigen gereinigt) und anti-v-myc IgG (aus MS2-v-myc mit dem Antigen gereinigt).Die Abszisse gibt die Menge der eingesetzten IgG's an.

3.3.Anwendung des Antikörpers

3.3.1.Histologische Untersuchungen mittels APAAP-Methode

Um die Bedeutung des hu-c-myc Genprodukts für normale und maligne Zellen zu erforschen,ist es wichtig zu wissen,ob es in verschiedenen Gewebsschnitten unterschiedlich exprimiert wird und sich dort nachweisen läßt.

Da Gewebsschnitte der Tonsilla palatina zugänglich waren, wurden zuerst einmal diese untersucht.Dazu wurden bei den Gewebsschnitten der Tonsilla palatina immunhistologische Färbungen vorgenommen.Wegen ihrer hohen Sensibilität wurde die APAAP-Methode gewählt (Cordell et al.1984,siehe 2.2.20.).Mit dieser Methode können immobilisierte Antigen-Antikörperkomplexe dargestellt werden.Dazu wird mittels eines Brückenantikörpers ein weiterer Immunkomplex angelagert.Der hinzugefügte Immunkomplex besteht aus monoklonalem IgG,das gegen eine alkalische Phosphatase gerichtet ist.Zugleich tragen diese IgGs die alkalische Phosphatase an ihrem Fc-Teil,so daß sich Komplexe bilden können (Immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase, APAAP complexes).Auf diese Weise kann an ein Antigen sehr viel alkalische Phosphatase angelagert werden.Nach Zugabe eines farbbildendes Substrates der alkalischen Phosphatase wird eine Darstellung der Bezirke erzielt,die das Antigen beinhalten.

In solchen Untersuchungen wurden die Antiseren gegen das hu-c-myc und das v-myc Protein verglichen.Die immunhistologischen Färbungen der Präparate ergaben,daß vereinzelte Zellen vor allem in den Lymphfollikeln der Tonsilla palatina von beiden Seren erkannt wurden.Es fand sich bei diesen Zellen eine nukleäre Anfärbung.Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um solche,die kurz vor der Teilung stehen.Im Gegensatz zu dem v-myc Antiserum reagierten die Antikörper,die gegen das hu-c-myc Protein gerichtet waren,außerdem mit Zellen der basalen, oralen Mukosa.Hier war die Anfärbung vor allem zytoplasmatisch .Diese ist möglicherweise auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückzuführen.Abbildung 11 zeigt einen Gewebsschnitt der Tonsilla palatia,der mit hu-c-myc Antiserum inkubiert war und immunhistologisch angefärbt wurde.Pfeil 1 weist auf die basale,orale Mukosa,Pfeil 2 auf einen angefärbten Lymphozyten.

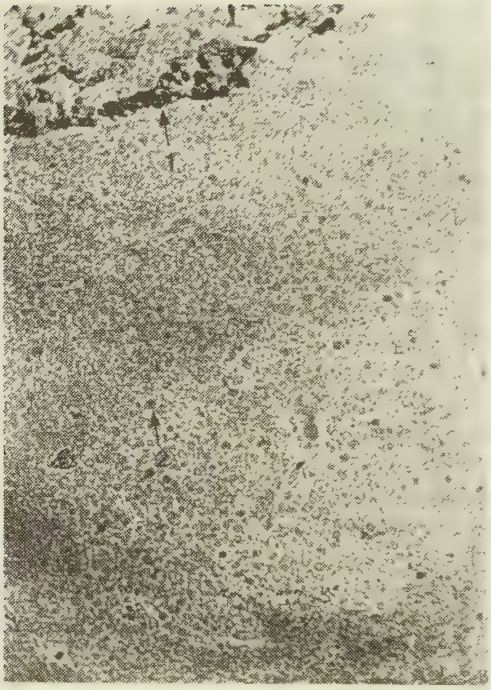

Abbildung 11

Schnitt durch die Tonsilla palatina

Das Präparat wurde nach der APAAP-Methode gefärbt.Pfeil 1 weist auf die Mukosa
Pfeil 2 weist auf einen Lymphozyten mit Anfärbung des Kerns

3.3.2.Lymphozytenstimulation

In einem Bericht aus der Gruppe von P.Leder war die Expression von hu-c-myc RNA in menschlichen Lymphozyten beschrieben worden,die für die Untersuchung des hu-c-myc Proteins sehr interessant erschien.Normlerweise können menschliche Lymphozyten in der Zellkultur nicht wachsen.Verwendet man jedoch Mitogene,so können sie sich teilen.Bei einer solchen Mitogen-stimulation war beobachtet worden,daß der hu-c-myc mRNA Gehalt sprunghaft anstieg und zwar etwa 10 bis 20fach in wenigen Stunden (Kelly et al.1983).

Da das menschliche hu-c-myc Protein normalerweise nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird,stellte sich die Frage,ob dieser mRNA Anstieg auch mit einer hohen hu-c-myc Proteinsynthese einherging.Dazu wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden mit Concanavalin A (Con A) stimuliert.Um die Proteinexpression verfolgen zu können,wurden die Zellen gleichzeitig mit ^{35}S-Methionin- haltigem Nährmedium inkubiert (siehe 2.2.21.).Die Inkubation erfolgte über 3 Stunden.Als Kontrolle wurden Lymphozyten inkubiert,welche allerdings kein Mitogen erhalten hatten.Zur Isolierung des Proteins wurden die Zellen lysiert (siehe 2.2.16.) und einer indirekten Radioimmunopräzipitation unterworfen.Es wurde dabei ein Antiserum gegen das hu-c-myc Protein verwendet.Um die spezifische Zunahme des hu-c-myc Proteins nachweisen zu können,wurde ein anderes Lymphozyten-eigenes Protein als Referenzprotein verwendet.Dazu wurde das β_2-Mikroglobulin ausgewählt,ein Glykoprotein,das normalerweise mit den Haupthistokompatibilitätsantigenen der Klasse I verbunden ist.Es wird bei Mitogenstimulation in dem betrachteten Zeitraum nicht induziert.Antiseren gegen β_2-Mikroglobulin sind außerdem komerziell erhältlich.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 12 gezeigt.Es stellt das Autoradiogramm der indirekten Radioimmunopräzipitation dar.Die stimulierten Lymphozyten sind durch ein + und die nicht-stimulierten Lymphozyten durch ein - Zeichen kenntlich gemacht.Es sind zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführte Experimente dargestellt.Mit den Antiseren gegen das hu-c-myc

Protein werden in den stimulierten Lymphozyten mehrere Banden erkannt,eine davon im Bereich des erwarteten Molekulargewichts des hu-c-myc Proteins von etwa 64000 D (jeweils Reihe 2).Die myc-Spezifität dieses Proteins läßt sich aus der Tatsache vermuten,daß dieses Protein in den nicht-stimulierten Lymphozyten nicht auftritt,die übrigen Banden jedoch auch dort nachweisbar und damit vermutlich unspezifisch sind.Weiterhin wurde Normalserum als Kontrolle eingesetzt (jeweils Reihe 1).Anti β_2-Mikroglobulin-Serum präzipitiert das β_2-Mikroglobulin (jeweils Reihe 3).Die Präzipitate zeigen,daß in den stimulierten Lymphozyten keine Erhöhung dieses Proteins vorliegt,obwohl seine Menge in den Duplikaten gewissen Schwankungen unterliegen.Außerdem ist die Menge an nachweisbarem vermutlichem myc Protein außerordentlich gering,so daß ein endgültiger Beweis für seine Identität nicht durchführbar war.Zur Kontrolle wurde ein radioaktiv markiertes Hela Zelllysat mitgeführt.Die Bande im 64 kD-Bereich ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

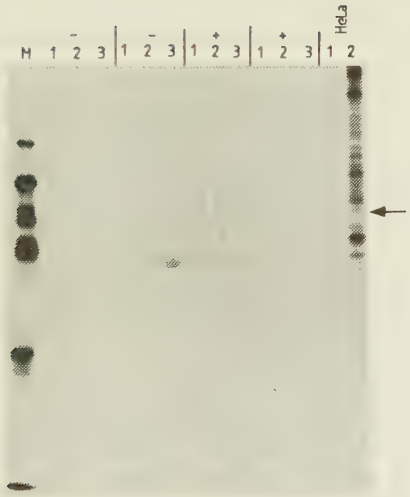

Abbildung 12

Indirekte Radioimmunopräzipitation von Mitogen-stimulierten Lymphozyten

Mit (+) sind die stimulierten,mit (-) die nicht-stimulierten Lymphozyten gekennzeichnet.Es ist ein Doppelansatz dargestellt.In Reihe 1 ist ein Normalserum, in Reihe 2 das MS2-hu-c-myc Antiserum und in Reihe 3 ein β_2-Mikroglobulin Antiserum erwendet worden.Als Kontrolle wurden Hela-Zellen benutzt.Die Laufhöhe des hu-c-myc Proteins ist durch einen Pfeil markiert.

4.Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte das Produkt des menschlichen Proto-Onkogens myc als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 64000 D identifiziert werden.Dieses gelang mit Hilfe eines Antiserums,das durch Immunisierung mit bakteriell expremierten MS2-hu-c-myc Exon III Protein entwickelt war.Aus diesem Polyvalentserum konnten,mittels synthetischer Peptide, Immunglobuline gewonnen werden,die spezifisch gegen Anteile des myc Proteins gerichtet waren.Eine weitere Bestätigung,daß es sich bei den produzierten Immunglobulinen um myc Antikörper handelt,ergab sich aus der Tatsache,daß von ihnen sowohl das menschliche myc Protein,als auch das gut charakterisierte virale myc Protein gebunden wurde.

Das hier mit 64 kD angegebene Molekulargewicht des hu-c-myc Genproduktes stimmt mit dem von anderen Arbeitsgruppen kürzlich veröffentlichten Molekulargewicht überein (Persson et al. 1984;Hann und Eisenman 1984;Benter et al.1985;Beimling et al.1985).Das menschliche,zelluläre myc Genprodukt unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von dem viralen Protein.Das hu-c-myc Protein kommt in einer etwa 10- bis 100fach geringeren Menge in menschlichen Tumorzellinien vor als das v-myc Protein in virusinfizierten Hühnerfibroblastenzellinien.Außerdem ist die Halbwertszeit des hu-c-myc gegenüber der des v-myc Proteins verkürzt und die Empfindlichkeit gegenüber Proteasen erhöht (Beimling et al. 1985).Diese erhöhte Proteasensensitivität wurde ebenfalls bei dem bakteriell-expremierten MS2-hu-c-myc Genprodukt beobachtet.Die Gründe und Bedeutungen dieser Beobachtungen sind unbekannt.Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen hu-c-myc und v-myc Protein ist die Differenz ihrer Molekulargewichte,die durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese bestimmt wurde.Das menschliche myc Genprodukt erscheint als Protein,das mit 64000 D fast 10000 D schwerer ist als das virale Protein.Das Molekulargewicht des viralen myc Genprodukts wurde mit 55000 D bestimmt (Bunte et al. 1984).Ein Vergleich der Sequenz von von hu-c-myc und v-myc ergibt,daß das virale Gen für 422 Aminosäuren,das menschliche für 446 Aminosäuren kodiert.Diese

Differenz kommt dadurch zustande,daß beim hu-c-myc einerseits 18 Aminosäuren deletiert sind,andererseits 42 zusätzliche Aminosäuren vorhanden sind.Die absolute Verlängerung des menschlichen myc Proteins um 24 Aminosäuren gegenüber dem viralen Protein kann jedoch nicht den Molekulargewichtsunterschied von fast 10000 D begründen.Da das v-myc Protein in einem anderen Molekulargewichtsbereich in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erscheint,als es der Berechnung aufgrund der Nukleotidsequenz entspricht,wurde angenommen,daß das v-myc Protein im Gel ein anormales Migrationsverhalten aufweist (Hann et al. 1983).Dieses könnte für das menschliche myc Protein ebenfalls zutreffen (Persson et al. 1984).

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit das menschliche myc Protein mittels Immunaffinitätschromatographie isoliert werden.Dabei wurde das Protein sehr rein dargestellt (Abbildung 8).Mit diesem Material konnte die Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen des hu-c-myc Proteins untersucht werden.Wie DNA-Filterbindungsstudien zeigten (Abbildung 10 A),bindet das hu-c-myc Protein DNA <u>in vitro</u>.Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit DNA-Bindungstests,die von einer anderen Arbeitsgruppe unternommen wurden (Persson and Leder 1984).Dabei wurde Proteingemische benutzt.Das virale myc Genprodukt ist als DNA-Bindungsprotein seit längerer Zeit bekannt (Donner et al. 1982;Bunte et al. 1984).Die DNA-Bindung ist bei den Viren der Myelozytomatosegruppe von entscheidener Bedeutung für die Zelltransformation (Ramsay et al.1982;Donner et al. 1983).Da die Bindungsstelle des v-myc Proteins,die sog. Cla I-Region,bekannt war (Donner et al.1983;Bunte et al.1984),lag es nahe,diese Region beim hu-c-myc Protein ebenfalls zu untersuchen.Dazu wurden inhibierende Antikörper Region im Filterbindungstest eingesetzt.Die stärkste Inhibition der DNA-Bindung wurde dabei mit Antikörpern erreicht,die sich gegen die Cla I-Region des c-myc Proteins richteten (Abbildung 12 B).

Es wäre von großer Bedeutung,wenn bekannt wäre,ob das c-myc Protein eine spezifische DNA-Sequenz erkennt und bindet.Daraus ließen sich weitere Schlußfolgerungen über die Funktion des Proteins ziehen.Zum Beispiel könnte das Protein einen direkten

Einfluß auf die DNA ausüben,wodurch die Transkription einzelner Gene selektiv aktiviert oder supprimiert wird.Solche sog. transacting transcriptional activators oder - suppressors werden in einigen Leukämieformen und bei AIDS aufgrund von Virusinfektionen gefunden.Daß das hu-c-myc Protein überhaupt eine Funktion an der DNA erfüllt,ist sehr wahrscheinlich,denn bei dem hu-c-myc Protein handelt es sich um ein Kernantigen mit geringer Halbwertszeit (Beimling et al. 1985).Solche Eigenschaften sind typisch für Proteine mit regulatorischen Funktionen.Werden Fibroblasten mit Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF,oder Lymphozyten mit Mitogenen, z.B.Con A, stimuliert,so wird in der frühen G_1-Phase myc mRNA verstärkt gebildet (Kelly et al. 1983).In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden,daß auch das hu-c-myc Protein in stimulierten Lymphozyten in einer sehr frühen Phase des Zellzyklus expremiert wird (Abbildung 12).Wenn diese Beobachtung tatsächlich im Zellzyklus von Bedeutung ist,so hätte das myc Protein die Aufgabe eines Kompetenzfaktors,der die Zellen auf die Proliferationsphase vorbereitet.Für diese Annahme spricht auch,daß bei Zellen,die normalerweise einen hohen myc mRNA Gehalt haben,nach Ausdifferzierung mittels Wachstumsfaktoren,ein Abfall der myc mRNA gemessen wurde (Gonda and Metcalf 1984).Die Funktion des myc Proteins scheint also nur für einen kurzen Zeitraum,der frühen G_1-Phase,des Zellzyklus benötigt zu werden,damit dann die Zelle in die Proliferationsphase eintreten kann.Danach wird es nicht mehr verstärkt exprimiert.

Immer mehr Hinweise liegen vor,die darauf hindeuten,daß das Proto-Onkogen myc bei einigen menschlichen Tumoren eine große Rolle spielt.Auf der Ebene der Gene wurden beim myc Genamplifikationen (Westin et al. 1982;Little et al. 1983) und Gentranslokationen (Taub et al.1982) festgestellt.Wie sich das hu-c-myc Protein in Tumoren verhält,ist sehr wenig untersucht.Das Ergebnis der Reinigung des hu-c-myc Proteins aus COLO 320 (siehe 3.2.3.) zeigt,daß das Protein nur in sehr geringer Menge in Tumorzellen vorkommt.Es mag sein,daß nicht die Menge des Proteins entscheidend für eine Zelltransformation ist,sondern daß eher der Zeitpunkt der myc Proteinexpression im Zellzyklus von Bedeutung ist.Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der myc Funktion beim Tumorgeschehen lieferte die Erkenntnis,daß die myc Genaktivierung

allein nicht für eine Transformation von primären Zellen in Kultur verantwortlich gemacht werden kann (Land et al.1983).Vielmehr ist noch ein weiteres aktives Onkogen dafür notwendig.Das myc Protein hätte in diesem Fall die Fähigkeit,den Zellen Unsterblichkeit zu verleihen,während das zweite Gen die Entartung verursacht.Das Tumorgeschehen ließe sich also als Mehr-Schritt-Genese auffassen,wobei das hu-c-myc Protein die Funktion eines Immortalisatiosfaktors hätte und dem zweiten Gen die Rolle des Transformationsfaktors zukäme.Neuerdings wird vermutet,daß eines dieser beiden Onkogene durch ein chemisches Karzinogen vertreten werden kann (Dotto et al.1985).All diese Entdeckungen auf molekularbiologischem Gebiet werden durch epidemiologische und biologische Untersuchungen unterstützt.

In wieweit diese Erkenntnisse in die klinische Diagnostik Einzug halten werden,ist Gegenstand momentaner Forschungen.Beim B-Zell-Lymphom vom Burkitt-Typ liegen in allen Fällen Chromosomentranslokationen vor,die das hu-c-myc Gen betreffen (Übersicht bei:Klein and Klein 1985).Nach Lokalisation der alpha-Kette des T-Zell-Rezeptors auf Chromosom 14 werden die gleichen Vorgänge für die Karzinogenese bei einigen T-Zell-Lymphomen verantwortlich gemacht.Für die Bestätigung einer Chromosomentranslokation mit myc Gen-Beteiligung sind bisher relativ aufwendige DNA-Untersuchungen notwendig.Kommt es jedoch bei einer solchen Gentranslokation zu einer,wenn auch vielleicht nur über den Zellzyklus kontinuierlichen, Steigerung der hu-c-myc Proteinexprimierung,so kann die Suche nach dem myc Genprodukt von Vorteil sein.Besonders histologische Untersuchungen sind hier von Bedeutung,da bei diesen der myc Proteingehalt eines Zellverbandes beurteilt werden kann.Mittels immunhistologischer Techniken (Immunfluoreszenz,APAAP-Färbung) lassen sich sehr geringe Mengen des myc Proteins nachweisen.In Abbildung 12 wurde ein Beispiel einer solchen Färbung gezeigt.Die dabei aufgetretenen Unspezifitäten ließen sich,wie das unterschiedliche Verhalten des hu-c-myc - und des v-myc Antiserums zeigte,vermeiden.Dazu müßten die Antikörper bestimmter Erkennungdeterminanten stark angereichert werden.Das gelingt mit der Herstellung von Peptid-spezifischen Immunglobulinen oder,optimal,mit monoklonalen Antikörpern.Damit wäre es eventuell sogar

möglich,Aminosäureaustausche in Proteinen zu erkennen.Solche Sequenzveränderungen sind z.B. bei dem Proto-Onkogen ras in den Zellen einer Blasenkarzinomzellinie nachgewiesen (Dhar et al.1982).Da mit monoklonalen Antikörpern Tumoren nach Oberflächenantigenen,z.T. auch nach intrazellulären Enzymen,klassifiziert werden können,ist es nicht abwegig eine Tumordifferenzierung auch aufgrund einer unterschiedlichen Genaktivierung oder Genveränderung von Proto-Onkogenen anzustreben.

Zusammenfassend läßt sich sagen,daß das Wissen um die Karzinogenese seit Entdeckung der Onkogene schnell zugenommen hat.Diese neuen Erkenntnisse fügen frühere Ergebnissen der Krebsforschung aneinander,wie z.B. chemische und virale Ätiologie von Tumoren.Weitere Untersuchungen der Onkogene und deren Proteine lassen schnelle Fortschritte erwarten,die Auswirkungen in der klinischen Diagnostik haben können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von gentechnologischen Methoden ein Teil des menschlichen,zellulären Proto-Onkogens myc in einen Expressionsvektor einkloniert und zur Proteinproduktion veranlaßt werden.Mit dem dabei entstandenem Protein,das Teile des humanen zellulären myc-Genprodukts enthielt,wurden Kaninchen mit Erfolg immunisiert.

Die dabei gewonnenen Antikörper dienten zur Molekulargewichtsbestimmung des hu-c-myc-Genprodukts,welches 64000 Dalton beträgt.Weiterhin konnte mittels der Antikörper eine Immunaffinitätssäule konstruiert werden,mit der aus einer menschlichen Tumorzellinie das hu-c-myc Protein hoch angereichert werden konnte.

Dieses isolierte hu-c-myc-Genprodukt wurde mit dem DNA-Filterbindungstest auf DNA-Bindungsfähigkeit untersucht,wobei sich das hu-myc-Genprodukt,wie es beim v-myc Protein schon bekannt war,als DNA-Bindungsprotein erwies. Einzelne IgG-Fraktionen des Antiserums wurden über Immunaffinitätssäulen gewonnen,die mit synthetischen Peptiden beladen waren.Mit diesen IgG-Fraktionen gelang die Spezifizierung der DNA-Bindungsstelle an dem als Cla I-Region bezeichneten hu-c-myc Proteinabschnitt.

Weiterhin wurde das hu-c-myc Antiserum eingesetzt,um das hu-c-myc Protein in menschlichen Zellen nachzuweisen.So zeigte sich im Lymphozytenstimulationstest,daß das myc-Genprodukt von stimulierten Lymphozyten in einer sehr frühen Phase vermehrt gebildet wird.

In histologischen Präparaten der Tonsilla palatina wurde das hu-c-myc-Genprodukt ebenfalls erkannt.Hier wurde es in den Kernen einiger Lymphozyten nachgewiesen.Allerdings fand hier eine Kreuzreaktion mit der basalen,oralen Mukosa statt.

5.Literaturverzeichnis

Alitalo,K.,Bishop,J.M.,Smith,D.H.,Chen,E.Y.,Colby,W.W.,
Levinson,A.D.:
Nucleotide sequenz of the v-myc oncogene of avian retrovirus
MC 29.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 ,100-104 (1983).

Alitalo,K.,Ramsay,G.,Bishop,J.M.,Pfeifer-Ohlsen,S.,Colby,W.W.,
Levinson,A.D.:
Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular
myc oncogenes
Nature 306 ,274-277 (1983).

Appleyard,R.K.
Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly
lysogenic strain derived from Escherichia coli K 12
Genetics 39 ,440-452 (1954)

Baltimore,D.:
Viral RNA-dependent DNA polymerase.
Nature Vol. 226 pp. 1209-1211 (1970).

Battey,J.,Moulding,C.,Taub,R.,Murphy,W.,Stewart,T., Potter,H.,
Lenoir,G., Leder,P.
The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation
into the IgH locus in Burkitt lymphoma.
Cell 34, 779-787 (1983).

Beard,J.W.:
Biology of avian oncornavirus.
In:Viral Oncology (Hrsg.Klein,G.) pp. 55-87 (1980).Raven Press,New
York.

Beimling,P.,Benter,T.,Sander,T., Mölling,K.:
Isolation and characterization of the human cellular myc gene
product.
Biochemistry 24,6349-6355 (1985).

Benter,T.,Beimling,P.,Pfaff,E.,Sander,T., Heimann,B.,Mölling,K.:
Identification of the human cellular myc gene product by antibody against the bacterially expressed protein.
In: Modern Trends in Human Leukemia VI (R.Neth, R.C.Gallo, M.F.Greaves, M.A.S.Moore, K.Winkler eds.) Springer-Verlag Berlin-New York ,266-268 (1985).

Bolivar,F.,Rodriguez,R.L.,Greene,P.J.,Betlach,M.C.,Heynecker,H.L., Boyer,H.W.,Crosa,J.H.,Falkow,S.:
Construction and characterization of new cloning vehicles.II.A multipurpose cloning system.
Gene 2,95-113 (1977).

Boyer,H.W.,and Roulland-Dussoix,D.:
A complementation analysis of the restriktion and modification of DNA in Escherichia coli
J.Mol.Biol. 41 ,459-472 (1969)

Broder,S. and Gallo,R.C.:
A Pathogenic Retrovirus (HTLV III).Linked To AIDS.
The New England Journal of Medicine Vol.311,No.20
pp.1292-1296,(1984).

Bunte,T.,Donner,P.,Pfaff,E.,Reis,B.,Greiser-Wilke,I.,Schaller,H., Mölling,K.:Inhibition of DNA binding of purified p55^{v-myc} in vitro by antibodies against bacterially expressed myc protein
EMBO J. 3 1919-1924 (1984).

Bunte,T.,Greiser-Wilke,I., Mölling,K.:
The transforming protein of the MC29-related virus CMII is a nuclear DNA-binding protein whereas MH2 codes for a cytoplasmic RNA-DNA binding polyprotein
EMBO J. 2 1087-1092 (1983).

Capon,D.J.,Chen,E.Y.,Levinson,A.D.,Seeburg,P.H.,Goeddel,D.V.:
Complete nucleotide sequenz of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologons.
Nature 302 33-37 (1983).

Coffin,J.M.,Billeter,M.A.:
Aphysical map of the Rous Sarcoma virus genom.
J.Mol.Biol. 100 ,293-318 (1976).

Colby,W.W.,Chen,E.Y.,Smith,D.H.,Levinson,A.D.:
Identification and nucleotide sequenz of a human locus homologons to the v-myc oncogen of avian myelocytomatosis virus MC29.
Nature 301 ,723-725 (1983).

Collins,S.,and Groudine,M.
Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line.
Nature 298 ,679-681 (1982).

Cordell,J.L.,Brunangelo,F.,Erber,W.,Ghosh,A.K.,Abdulaziz,Z.,
Macdonald.S.,Pulford,K.A.F.,Stein,H., Mason,D.Y.:
Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes)
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 32 ,no.2 ,219-229 (1984).

Croce,C.,Thierfelder,W. Erikson,J.,Nishikura,K.,Finan,J.,
Lenoir,G.,Rabbitts,T.,Nowell,P.:
Transcribtional activations of an unrerranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a c-lambda locus in Burkitt Lymphoma cells.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA80 ,6922-6926 (1983).

Dalla Favera,R.,Bregni,M.,Erikson,J.,Patterson,D., Gallo,R.C.,
Croce,C.M.:
Assignment of the human c-myc onc-gene to the region of chromosome 8 which is translocated in Burkitt Lymphoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 7824-7827 (1982).

Dalla Favera,R.,Gelman,E.P.,Martinotti,S.,Franchini,G.,Papas,T.S.,
Gallo,R.C., Wong-Staal,F.:
Cloning and characterization of different human sequences related

to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomazosis virus (MC29).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 6497-6501 (1982).

Dalla Favera,R.,Wong-Staal,F.,Gallo,R.C.:
Onc-gene amplification in promyelocytic leukaemic cells of the same patient.
Nature 299 61-63 (1982).

Der,J.C.,Krontiris,T.G., Cooper,G.M.:Transforming genes of humans bladder and lung carcinoma cell lines are homologons to the ras genes of Harvey and Kirsten Sarcoma viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 3637-3640.

Dhar,R.,Ellis,R.W.,Shih,T.Y,Oroszlav,S.,Shapiro,B.,Maizel,J.,
Lowy,D.,Scolnik,E.M.:
Nucleotid sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus.
Science 217 934-937 (1982).

Dickson,C.,Eisenman,R.N.,Fan,H.,Hunter,E.,Teich,N.:
Protein biosynthesis and assembly.
In:RNA Tumor Viruses (Hrsg.
Weiss,R.,Teich,N.,Varmus,H.E.,Coffin,J.M.), pp 513-648 (1982).Cold Spring Harbor Laboratory,New York.

Doolittle,R.F.,Hunkapiller,M.W.,Hood,L.E.,Devare,S.G.,Robbins,K.C.,
Aaronson,S.A., Antonides,H.N.:
Simian Sarcoma virus onc gene,v-sis,is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor.
Science 221, 275-277 (1983).

Donner,P.,Bunte,T.,Greiser-Wilke,I., Mölling,K.:
Decreased DNA-binding ability of purified transforming-specific proteins from deletion mutants of the avian myelomatosis virus.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 80, 2861-2865 (1983).

Donner,P.,Greiser-Wilke,I., Mölling,K.:
Nuclear localization of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus.

Nature 296, 262-266 (1982).

Dotto,G.P.,Parada,L.F., Weinberg,R.A.:
Specific growth response of ras-transformed fibroblasts to tumour promotors.
Nature 318 ,472-475 (1985).

Downward,J.,Yarden,Y.,Mayes,E.,Scrace,G.,Totty,N.,Stockwell,P., Ullrich,A.,Schlessinger,J., Waterfield,M.D.:
Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb B onco-gene protein sequences.
Nature 307, 521-527 (1984).

Ellermann,W.,Bang,O.:
Experimentelle Leukämie bei Hühnern.
Yental. Bakteriol. 60, 595-609 (1908).

Enrietto,P.J.,Hayman,M.J.:
Restriction enzyme analysis of partially transformation-defective mutants of acute leukemia virus MC29.
J. at Virology 44, 711-715 (1982).

Fujinami,A.,Inamoto,K.:
Über Geschwülste bei japanischen Haushühnern,insbesondere über einen transplantablen Tumor.
Z. Krebsforsch. 14, 94-119 (1914).

Gallwitz,D.,Donath,C.,Sander,C.:
A yeast gene encoding a protein homologons to the human c-has/bas proto-oncogene product.
Nature 306, 704-707 (1983).

Gonda,T.J.,and Metcalf,D.
Expression of myb,myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia
Nature 310 ,249-251 (1984)

Graf,T.,and Beug,H.:
Avian leukemia viruses: Interaction with their target cells in

vivo and in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 516, 269-299 (1978).

Gross,L.:
Spontaneus Leukemia Developing in C3H Mice Following Inoculation,in Infancy,with Ak-Leukemic Extracts,or Ak-Embryos.
Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 76, 27-32 (1951).

Hamlyn,P.H. and Rabbitts T.H.:
Translocation joins c-myc and immunoglobin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene.
Nature 304,135-139 (1983).

Hann,S.,Abrams,H.,Rohrschneider,L. and Eisenmann,R.:
Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes:identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma all lines.
Cell 34,789-798 (1983).

Hann,S.R. and Eisenmann,R.N.:
Proteins Encoded by the Human c-myc Oncogene:Differntial Expression in Neoplastic Cells.
Molekular and Cellular Biology 4,2486-2497 (1984).

Hayward,W.S.,Neel,B.G.,Astrin,S.M.:
Activation of a cellular onc-gene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukosis.
Nature 290, 475-480 (1981).

Heldin,C.-H.,Westermark,B.:
Growth Factors:Mechanism of Action and Relation to Oncogenes.
Cell 37,9-20 (1984).

Ivanov,X.,Mladenov,Z.,Nedyalkov,S.,Todorov,T.G.,Yakimov,M.:
Experimental investigation into avian leukosis.V.Transmission,haematology and morphology of avian myelocytomatosis.
Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux 10,5-38 (1964).

Kalyanaraman,V.S.,Sarngadharan,M.G.,Robert-Guroff,M.,Miyoshi,I.,
Blayney,D.,Golde,D. and Gallo,R.C.:
A new subtype of Human T-cell leukemia virus (HTLV II) associated
with a T-cell variant of Hairy-cell Leukemia.
Science 218, pp 571-573 (1982).

Kelly,K.,Cochran,B.H.,Stiles,C.D. and Leder,P.:
Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens
and platelet-derived growth factor.
Cell 35,603-610 (1983).

Klein,G.:
The role of gene dosage and genetic transpositions in
carcinogenisis.
Nature 294,313-318 (1981).

Klein,G.,and Klein,E.:
Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations:some new
insights,puzzles and paradoxes.
Immunology Today 6,208-215 (1985).

Klein,G.,and Klein,E.:
Oncogene activation and tumor progression.
Carcinogenesis 5, 429 (1984).

Kuepper,H.,Delamarterj,J.,Otto,B.,and Schaller,H.:
Expression of mazure food and mouse disease antigen in E. coli..
Proc. 4th Intern. Symp. on Genetics of Industrials Micro
Organisms, 222-226 (1982).

Kyte,J.,and Doolittle,R.F.
A simple method for displaying the hydropathic character of a
protein.
J. of Mol. Biolo. 157 ,105-132 (1982).

Land,H.,Parada,L.F.,Weinberg,R.A.:
Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at
least two cooperating oncogenes.
Nature 304 ,596-602 (1983).

Laurence,J.,Brun-Vezinet,F.,Schutzer,S.E.,Rouzioux,Ch.,
Klatzmann,D.,Barre-Sinoussi,F.,Chermann,J.-C.,and Montagnier,L.:
Lymphadenopathy-associated viral antibody in AIDS.
The New England Journal of Medicine Vol 311, No 20, 1269-1273
(1984).

Lautenberger,I.A.,Schultz,R.A.,Garon,C.F.,Tschichlis,P.N.,
Papas,T.S.:
Molecular cloning of avian myelocytomatosis virus (MC29)
transforming sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1518-1522 (1981).

Leder,P.,Battey,J.,Lenoir,G.,Moulding,C.,Murphy,W.,
Potter,H.,Stewart,To.,Taub,R.:
Translocations among antibody genes in human cancer.
Science 222, 765-771 (1983).

Little,C.D.,Nau,M.N.,Carney,D.N.,Gazdar,A.F.,Minna,J.D.:
Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung
cancer cell lines.
Nature 306, 194-196 (1983).

Maniatis,T.,Fritsch,E.F.,Sambrook,J.:
Molecular cloning: A laboratory manual (1982).
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Marinus and Morris:
Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (dam 3)
in E.coli K 12.
Mutat.Res. 28 ,15-26.

Martin,G.S.:
Rous Sarcoma Virus: A function required for the maintenance of the
transformed state.
Nature 227, pp 1021-1023 (1970).

Merrifield,R.B.:
Solid Phase Synthesis: I. The Synthesis of Tetrapeptide.
J.Am.Chem.Soc. 85, 2149-2154 (1963).

Mladenow,Z.,Heine,V.,Beard,D.,and Beard,J.W.:
Strain MC29 avian leukosis virus.Myelocytoma, endothelioma, and renal growth: pathomorphological and ultrastructural aspects.
J.Natl.Cancer Inst. 38 ,251-185 (1967).

Mölling,K.:
Fusion in retroviral transformation.
In: Weinhouse,S.,Klein,G.(eds) Advances in cancer research, Vol 43, Academic. New York p. 305-339 (1985).

Mölling,K.,Benter,T.,Bunte,T.,Pfaff,E.,Deppert,W.,
Egly,J.M.,Miyamoto,N.B.:
Properties of the myc-gene product: nuclear association,inhibition of transcription and activation in stimulated lymphocytes.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 113 ,198-207 (1985).

Mölling,K.,Bolognesi,D.P.;Bauer,H.,Büsen,W.,Plassmann,H.W.,
Hausen,P.:
Association of Viral Reverse Transcriptase with an Enzyme degrading the RNA.Moiety of RNA-DNA Hybrids.
Nature 234, pp 240-243 (1971).

Nishikawa,K.,Kubota,Y.,Ooi,T.:
Classification of proteins into groups based on amino acid composition and other characters.
J. of Biochem.(Tokyo) 94 ,981-1007 (1983).

Nooter,K.,Aarssen A.M.,Bentvelzen,P.,deGroot,F.G.,van Pelt,F.G.:
Isolation of infectious C-type oncornavirus from human leukaemic bone marrow cells.
Nature 256 ,595-597 (1975).

Panem,S.,Prochownik,E.V.,Kirsten,W.H.:
Isolation of type-C virions from a normal human fibroblast strain.
Science 189 ,297-299 (1975).

Persson,H.,Hennighausen,L.,DeGrado,W.,Leder,P.:
Antibodies to human c-myc oncogene product: evidence of an evolutionarily conserved protein during cell proliferation.

Science 225 ,687-693 (1984).

Persson,H. and Leder,P.:
Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene.
Science 225 ,718-721 (1983).

Poiesz,B.J.,Ruscetti,F.W.,Gazdar,A.F.,Bunn,P.A.,
Minna,J.D.,Gallo,R.C.:
Detection and isolation of type C particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.
Proc.Natl.Acad.Sci. 77 ,7415-7419 (1980).

Puck,T.T.,Marcus,P.I.,Cieciura,S.:
Clonal growth of mammaline cells in vitro.
J.Exp.Med. 103 ,273-284 (1956).

Ramsay,G.M.,Enrietto,P.J.,Graf,T.,Hayman,M.J.:
Recovery of myc-specific sequences by a partially transformation-defective mutant of avian myelocytomatosis virus,MC29,correlates with the restoration of transforming activity.
Proc.Natl.Acad.Sci. 79 ,6885-6889 (1982).

Ramsay,G.M.,Graf,T.,Hayman,M.J.:
Mutants of avian myelocytomatosis virus with a smaller gag gene-related protein have an altered transforming ability.
Nature 288 ,170-172 (1980).

Ramsay,G.M. and Hayman,M.J.:
Isolation and biochemical charakterization of partially transforming- defective mutants of avian myelocytomatosis virus strain MC29: Localization of the myc domain of the 110.000 Dalton gag-myc polyprotein.
J.Virol. 41 ,745-753 (1982).

Reddy,E.P.,Reynolds,R.K.,Watson,D.K.,Schultz,R.A.,
Lautenberger,J.A.,Papas,T.S.:
Nucleotid sequence analysis of the proviral genome of avian

myelocytomatosis virus (MC29).
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80 ,2500-2504 (1983).

Remault,E.,Staussens,P.,Fiers,W.:
Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the the P_L promotor of coliphage lambda.
Gene 15 ,81-93 (1981).

Rigby,P.W.J.,Dieckmann,M.,Rhodes,C.,Berg,P.:
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J.Mol.Biol. 113 ,237-251 (1977).

Rous,P.:
A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells.
J.Exp.Med. 13 ,397-411 (1911).

Schlom,J.,Spiegelman,S.,Moore,D.:
RNA-dependent DNA polymerase activity in virus-like particles isolated from human milk.
Nature 231 ,97-100 (1971).

Schwab,M.,Alitalo,K.,Klempnauer,K.-H.,Varmus,H.E.,Bishop,J.M.,
Gilbert,F., Brodeur,G.,Goldstein,M.,Trent,J.:
Amplified DNA with limited homology to the myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor.
Nature 305 ,245-248 (1983).

Sherr,C.J.,Rettenmier,C.W.,Sacca,R.,Roussel,M.F.,
Look,A.T.,Stanley,E.R.:
The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor,CSF-1.
Cell 41 ,665-676 (1985).

Shilo,B.Z. and Weinberg,R.A.:
DNA-sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in Drosophila melanogaster.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78 ,6789-6792 (1981).

Slamon,D.J.,deKernion,J.B.,Verma,I.M.,Cline,M.J.:
Expression of cellular oncogenes in human malignancies.
Science 224 ,256-262 (1984).

Stehelin,D.,Varmus,H.E.,Bishop,J.M.,Vogt,P.K.:
DNA related to the transforming gene of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA.
Nature 260 ,170-173 (1976).

Taub,R.,Kirsch,I.,Morton,C.,Lenoir,G.,Swan,D.,Tronick,S.,
Aaronson,S.,Leder,P.:
Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79 ,7837-7841 (1982).

Temin,H.M. and Mizutani,S.:
RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.
Nature 226 ,1211-1213 (1970).

Thomas,P.S.:
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 ,5201-5205 (1980).

Vennström,B.,Moscovici,C.,Goodman,H.M.,Bishop,J.M.:
Molecular cloning of the avian myelocytomatosis virus genome and recovery of infectious virus by transfection of chicken cells.
J.Virology 39 ,625-631 (1981).

Vennström,B.,Sheiness,D.,Zabielski,J.,Bishop,J.M.:
Isolation and characterization of c-myc,a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of myelocytomatosis virus strain MC29.
J.Virology 42 ,773-779 (1982).

Wang,L.-H.,Duesberg,P.H.,Beemon,K.,Vogt,P.K.:
Mapping RNase T_1-resistant oligonucleotides of avian tumor virus

RNAs: sarcoma-specific oligonucleotides are near the poly(A) end and oligonucleotides common to sarcoma and transformation-defective viruses are at the poly(A) end.
J.Virology 16 ,1051-1070 (1975).

Waterfield,M.D.,Scrace,G.T.,Whittle,N.,Stroobant,P., Johnsson,A., Wasteson,A., Westermark,B.,Heldin,C.-H.,Huang,J.S.,Deuel,T.F.:
Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus.
Nature 304 ,35-39 (1983).

Watt,R.,Stanton,L.W.,Marcu,K.B.,Gallo,R.C.,Croce,C.M.,Rovera,G.:
Nucleotid sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene.
Nature 303 ,725-728 (1983).

Weiss,R.A.:
More putative human tumor viruses.
Nature 252 ,190 (1973).

Westin,E.H.,Wong-Staal,F.,Gelman,E.P.,Dalla Favera,R., Papas,T.S.,Lautenberger,J.A.,Eva,A.,Reddy,E.P., Tronick,S.R.,Aaronson,S.A.,Gallo,R.C.:
Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human haematopoetic cells.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79 ,2490-2494 (1982).

White,B.A. and Bancroft,F.C.:
Cytoplasmic dot hybridization.
The Journal of Biol.Chem. 257 ,8569-8572 (1982).

Zech,L.,Haglund,V.,Nilsson,N.,Klein,G.:
Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and nonBurkitt lymphomas.
Int.J.Cancer 17 ,47-51 (1975).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem durchgeführt.

Frau Priv.-Doz.Dr.K.Mölling danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Anleitung.Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen waren entscheidend für die Anfertigung der Arbeit.Besonders danke ich ihr für ihre stete wissenschaftliche Förderung.Herrn Prof.Dr.H.Schuster bin ich für die großzügige Bereitstellung der Mittel und für die guten Arbeitsbedingungen zu Dank verpflichtet.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe,Dr.Peter Beimling, Dr.Thomas Bunte, Dr.Peter Donner, Dr.Barbara Heimann, Sylvia Rabe, Sabine Richter, Dr.Thomas Sander und Sabine Sukrow,danke ich sehr für ihre Mithilfe,Ratschläge und Kritik.

Herrn Prof.Dr.H.Stein und Herrn Dr.J.Gerdes danke ich für die freundliche Unterstützung bei den immunhistologischen Untersuchungen.

Herrn Dr.G.Sieber bin ich für sein Entgegenkommen bei der Suche nach Zellen und sein Interesse an der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Bei Herrn Prof.Dr.H.Rühl möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Referats bedanken.

Lebenslauf

21.12.1955 geboren in Hannover als zweiter Sohn des Arztes Dr.Wolfgang Benter und dessen Frau Eva,geb.Lasch

April 1962-66 Besuch der Albert-Schweitzer-Grundschule in Lehrte

Juli 1966-Mai 1974 Besuch des Gymnasiums Lehrte mit Abitur

Okt.1974-76 Studium der Theaterwissenschaft,Germanistik und Mathematik an der Freien Universität Berlin

1977-78 Zivildienst an der Medizinischen Hochschule Hannover

Juli 1978-79 Tätigkeit in der Abteilung für Immunhämatologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover

Okt.1979 Beginn des Studiums der Medizin an der Freien Universität Berlin

Feb.1980-82 Tätigkeit in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Klinikums Steglitz

März 1983-85 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Priv.-Doz.Dr.K.Mölling am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik,Berlin

Nov.1985 Abschluß des Studiums mit Approbation als Arzt